

**COMPETICIÓN CELULAR Y
DESARROLLO DE TUMORES EN
DISCOS IMAGINALES DE
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**COMPETICIÓN CELULAR Y
DESARROLLO DE TUMORES EN
DISCOS IMAGINALES DE
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

**MEMORIA PRESENTADA POR
JAVIER MENÉNDEZ GONZÁLEZ
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS**






**DIRECTOR DE LA TESIS:
Prof. GINES MORATA PÉREZ**





**TUTORA DE LA TESIS:
Profra. SONSOLES CAMPUZANO CORRALES**

**Este trabajo ha sido realizado
en el Departamento de Biología Molecular;
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM).
MADRID**

A mis padres.

ÍNDICE

Abreviaturas	13
 ABSTRACT	15
 I. INTRODUCCIÓN	19
Introducción a la biología del desarrollo	21
<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	22
Discos imaginales	23
Competición celular	27
Apoptosis en <i>Drosophila</i>	30
Regulación y ejecución de la apoptosis	30
La vía de c-Jun N-terminal Kinasa (JNK)	32
<i>Drosophila</i> como modelo de cáncer	33
Rutas implicadas en la formación de tumores en <i>Drosophila</i>	34
Ruta polaridad apico-basal	35
Ruta endocítica	36
Ruta de Hippo	36
Células no muertas	39
Capacidad tumorigénica de <i>lethal giant larvae</i>	40
 II. OBJETIVOS	43
 III. MATERIALES Y MÉTODOS	47
Medios de cultivo	49
Estirpes de moscas y metodología	49
Generación de clones	51
Inmunohistoquímica	53
Adquisición y tratamiento de imágenes	53
 IV. RESULTADOS	55
Compartimentos mutantes para <i>lgl</i> forman tumores neoplásicos	57
Clones mutantes para <i>lgl</i> son eliminados por competición celular	61
Clones mutantes para <i>lgl</i> en los que se impide la muerte no forman tumores	62

Los clones <i>lgl</i> ^{-/-} tiene una tasa de crecimiento normal	64
Potencial tumorigénico de las células <i>lgl</i> ^{-/-} que sobreexpresan Ras ^{V12}	66
Los clones <i>lgl</i> ^{-/-} Ras ^{V12} proliferan más rápido que las células silvestres	67
Clones <i>lgl</i> ^{-/-} Ras ^{V12} son eliminados en un contexto <i>lgl</i> ⁺	69
Los clones <i>lgl</i> ^{-/-} Ras ^{V12} son capaces de unirse y formar un microambiente que los protege de la muerte	73
Los clones <i>lgl</i> ^{-/-} Ras ^{V12} tiene la vía de Hippo inhibida	76
Clones <i>lgl</i> ^{-/-} UASYki son capaces de formar tumores e invadir el disco	81
 V. DISCUSIÓN	85
Las células <i>lgl</i> ^{-/-} son eliminadas por competición celular pero no debido a una menor tasa de proliferación	88
La inhibición de la vía de Hippo es uno de los factores críticos a la hora de dar capacidad a las células <i>lgl</i> ^{-/-} para formar tumores	90
Los clones <i>lgl</i> ^{-/-} Ras ^{V12} son capaces de fusionarse y formar un microambiente que los protege de la competición celular dando lugar a tumores.	91
La competición celular como mecanismo supresor de tumores	93
Relevancia de los resultados obtenidos en mamíferos	96
Competición celular como mecanismo supresor de tumores	96
¿Origen policlonal del cáncer?	97
 VI. CONCLUSIONES	99
 VII. BIBLIOGRAFÍA	103
 VIII. ANEXO	119

A	Anterior
AEL	Tras la puesta de huevos, del inglés “After Egg Laying”
AHS	Después del choque térmico, del inglés “After Heat Shock”
<i>ap</i>	<i>apterous</i>
<i>avl</i>	<i>avalanche</i>
BrdU	Bromo-desoxiUridina
BSA	Albúmina de Suero Bovina
<i>bsk</i>	<i>basket</i>
<i>bst</i>	<i>belly spot and tail</i>
<i>cycE</i>	<i>ciclina E</i>
cols	colaboradores
D	Dorsal
<i>dlg</i>	<i>disc large</i>
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
Ds	Dachsous
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>ept</i>	<i>erupted</i>
<i>ey</i>	<i>eyeless</i>
Ft	Fat
Flp	Flipasa
FRT	“Flipase Recombination Target”
GFP	“Green Fluorescent Protein”
<i>hep</i>	<i>hemipterous</i>
<i>hid</i>	<i>head involution defective</i>
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
hs	promotor de “Heat Shock Protein”
<i>hpo</i>	<i>hippo</i>

IAPs	“Inhibitor of Apoptosis Proteins”
JNK	Jun N-terminal Kinasa
Lac-Z	β-Galatosidasa
<i>lgl</i>	<i>lethal giant larvae</i>
<i>M</i>	<i>Minute</i>
MARCM	“Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker”
P	Posterior
PH3	Fosfo-Histona 3
<i>puc</i>	<i>puckered</i>
<i>rpr</i>	<i>reaper</i>
<i>sal</i>	<i>spalt</i>
<i>sav</i>	<i>salvador</i>
<i>skl</i>	<i>sickle</i>
<i>scrib</i>	<i>scribble</i>
<i>sd</i>	<i>scalloped</i>
tub	Promotor general de la tubulina
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end-labelling
UAS	“Upstream Activating Sequence”
V	Ventral
<i>w</i>	<i>white</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>wt</i>	<i>warts</i>
<i>y</i>	<i>yellow</i>
<i>yki</i>	<i>yorkie</i>

ABSTRACT

Mutant larvae for the *lethal giant larvae (lgl)* gene of *Drosophila* develop neoplastic tumours in imaginal discs. However, individual *lgl* mutant clones do not form tumours when surrounded by wildtype tissue, suggesting the existence of a tumour-suppressing mechanism which operates against isolated mutant cells. We have investigated the tumourigenic potential of *lgl* mutant cells by generating wing disc compartments that are entirely mutant for *lgl*, and also inducing clones of various genetic combinations of *lgl* cells surrounded by wildtype cells. We find that while *lgl* compartments can grow indefinitely, *lgl* clones are eliminated by a process akin to cell competition. Nevertheless, large clones of *lgl* mutant cells may form tumours if they acquire constitutive activity of the Ras pathway (*lgl* UASRas^{V12}), which confers proliferation advantage through inhibition of the Hippo pathway. Yet, most small *lgl* UAS-Ras^{V12} clones do not normally form tumours because most of them are eliminated in spite of their high proliferation rate. The formation of a tumour requires in addition the formation of a microenvironment that allows mutant cells to evade cell competition.

I. INTRODUCCIÓN

Introducción a la biología del desarrollo

La biología del desarrollo estudia los procesos que dan lugar a la formación de un individuo adulto a partir de una única célula indiferenciada o cigoto. Esto se produce a través de sucesivas divisiones celulares que van generando un organismo tridimensional formado por células que varían tanto en su morfología como en las funciones que desempeñan. Sin embargo, todas las células de un individuo son descendientes de la misma célula madre y comparten por tanto el mismo material genético, por lo que su capacidad para diferenciarse y especializarse en distintas funciones se debe a una expresión génica diferencial.

La formación de un organismo adulto requiere que las células sean capaces de comunicarse y de integrar señales de proliferación, de diferenciación y de muerte celular o apoptosis. La correcta integración de esta información da lugar, por ejemplo, a que todos los miembros de una misma especie presenten unos patrones constantes tanto en tamaño como en morfología y que todos los órganos y estructuras de un individuo mantengan una proporción adecuada. De manera recíproca fallos en la capacidad de las células para comunicarse, así como en la interpretación de señales de proliferación, diferenciación o muerte dan lugar a diversas anomalías, entre las que se encuentra el cáncer. A lo largo de los años, la biología del desarrollo ha conseguido desentrañar algunas de las vías de señalización responsables de la formación de estos patrones, sin embargo el descubrimiento más importante de esta disciplina ha llegado del estudio comparado de estas vías de señalización en distintas especies. Ello llevó a la constatación de que la mayoría de los procesos implicados en la formación de un individuo adulto están conservados en el Reino Animal y de que el número de estos procesos no es tan grande como se pensaba sino que los mismos recursos se utilizan repetidamente durante el desarrollo (Carroll y cols., 2001)

La universalidad de estos procesos ha permitido la utilización de modelos animales para caracterizar y posteriormente tratar de extrapolar al ser humano las vías de señalización implicadas en el desarrollo. Ejemplos de ello son la utilización del ratón (*Mus musculus*), el gusano nematodo (*Caenorhabditis elegans*), el pez cebra (*Danio rerio*) o la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, como modelos de experimentación.

***Drosophila melanogaster* como organismo modelo**

Drosophila empezó a utilizarse como organismo modelo a principios del siglo XX por Thomas Hunt Morgan y su escuela, por lo que lleva casi un siglo sirviendo como organismo modelo. Durante todo este tiempo de estudio se ha llegado a un conocimiento muy extenso de la mosca, posibilitando la generación y desarrollo de multitud de herramientas tanto genéticas como moleculares. Además de la gran tradición en investigación, cumple una serie de características que la convierten en un modelo de experimentación idónea: es fácil de mantener y de almacenar, se pueden conservar fácilmente distintas mutaciones durante varias generaciones mediante el uso de balanceadores (cromosomas con aberraciones que impiden la recombinación), tienen un ciclo vital muy corto (10 días a 25°C) y en gran medida de la redundancia genética de los mamíferos lo que permite un análisis más preciso de los fenotipos (Greenspan, R.J., 1997). Además desde hace algunos años contamos con su genoma completamente secuenciado. (Adams y cols., 2000).

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo que como tal sufre una metamorfosis completa. Las primeras 24 horas de su ciclo vital transcurren como embrión. A continuación pasa a la fase larvaria, en la que transcurren 4 días aproximadamente, a lo largo de los cuales se suceden tres estadios larvarios (Fig. 1). Durante este periodo unas estructuras internas, llamadas discos imaginales, se encuentran en fase proliferativa y terminarán dando lugar a la mayoría de las estructuras cuticulares del adulto. Tras finalizar el tercer estadio larvario, la larva entra en fase pupal. En este punto se inicia la metamorfosis y los tejidos larvarios son sustituidos por tejidos adultos. Los discos imaginales dejan de dividirse, pasando a proliferar unas células llamadas histoblastos, que son las que darán lugar al abdomen. Toda la estructura cuticular de la mosca adulta surge bien de los discos imaginales bien de los histoblastos. Tras esta fase pupal de 4-5 días emerge un individuo adulto o imago (Lawrence, 1992).

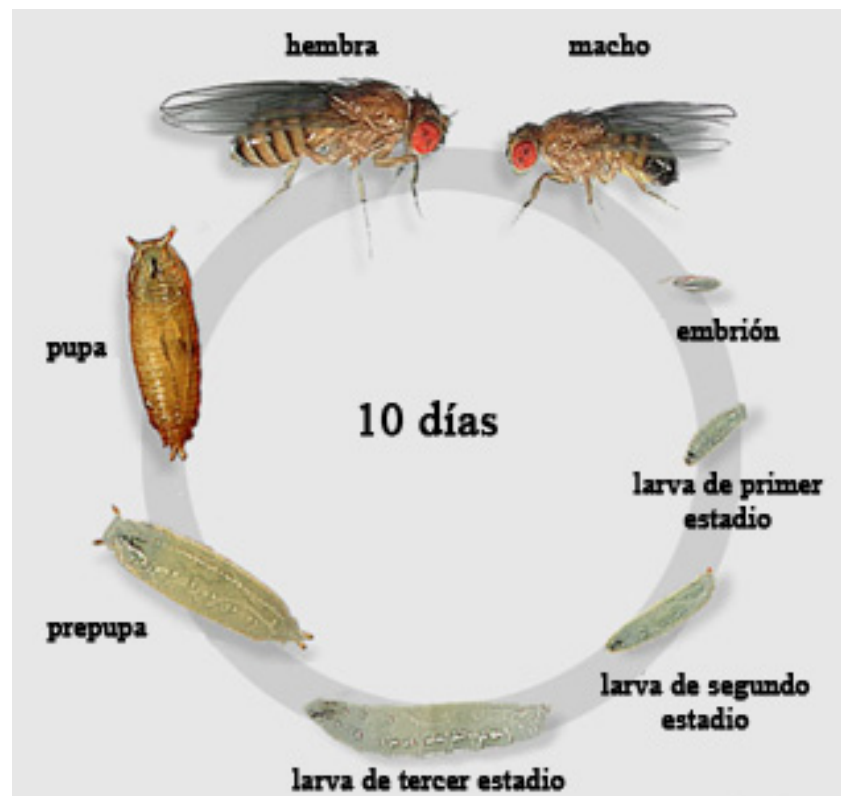


Figura 1. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster* a 25°C.

Tomado de Flymove.

Discos imaginales.

Los discos imaginales son estructuras en forma de saco, formadas por células epidérmicas que derivan de células invaginadas del ectodermo durante el final de la embriogénesis. Estas células embrionarias adquieren identidad de tejido imaginal mediante información posicional que se deriva de la interpretación de señales que reciben del exterior como son Wingless (*Wg*) y Decapentaplegic (*Dpp*). El origen de los discos imaginales es policlonal y el número de células que conforman el primordio varía según el disco que se analice. En el caso del disco de ala, se ha estimado que el número de células que lo componen al principio del desarrollo está entre 30 y 50 células (Cohen y cols., 1993; Martin y cols., 2009). Durante el periodo larvario, los discos imaginales proliferan y van adquiriendo una expresión génica diferencial, siendo finalmente responsables de la formación del exoesqueleto de la cabeza, el tórax, incluidos sus apéndices (las alas, patas y halterios), la genitalia y la analia en el adulto (Fig. 2). El ritmo de división de las células se va haciendo más lento a medida que se acerca la pupación para quedar finalmente detenido una vez se ha alcanzado el tamaño adecuado (Martin y cols., 2009; Martin y Morata, 2006).

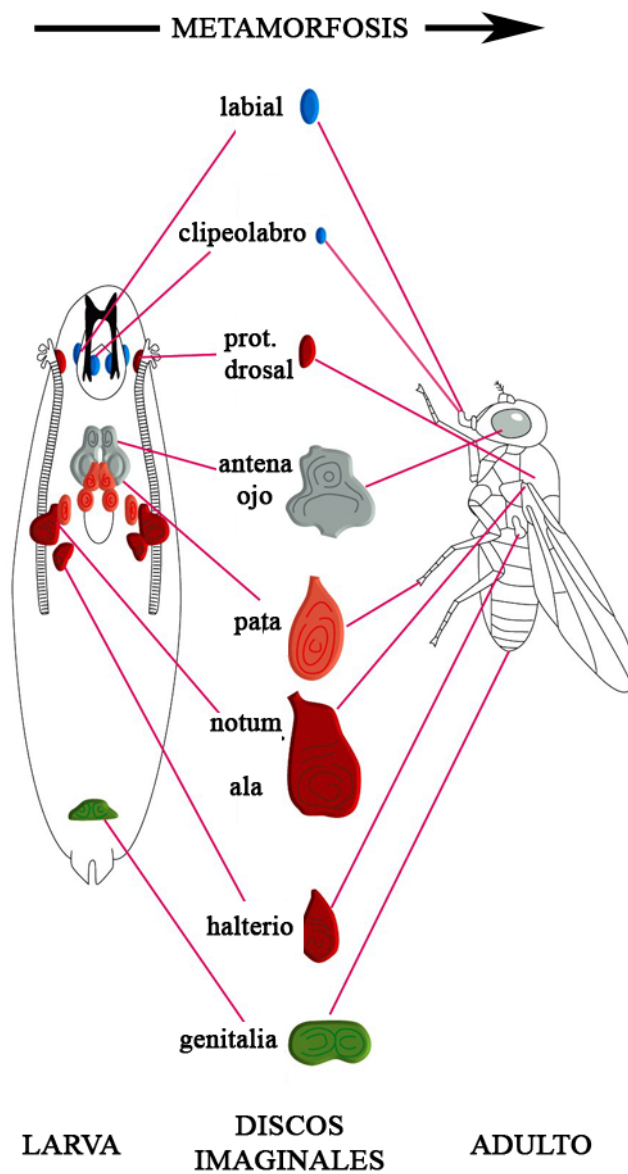


Figura 2. Representación de los discos imaginales en la larva de *Drosophila melanogaster* y los tejidos a los que da lugar en adulto.

Tomado de Alberts y cols., 2002.

Al final del periodo larvario, en los discos imaginales ya se encuentran establecidos todos los elementos de patrón morfológico que se observan en la cutícula adulta (Bryant, 1975). La identidad de cada tipo celular viene determinada por la localización de las células dentro del tejido. La señalización a la que están sometidas las células varía en las diferentes zonas del disco lo que finalmente da lugar a distintas identidades. (Lawrence, 1992). Cambios en la identidad de las células debido a una mala interpretación de estas señales puede llevar a la transformación de unas estructuras en otras, fenómeno conocido como transdeterminación,

o llegar a comprometer el crecimiento del disco imaginal. Una de las primeras identidades que se establecen en *Drosophila melanogaster* es la pertenencia al compartimento anterior o al posterior (García-Bellido y cols., 1973). Los compartimentos son unidades de linaje, por lo que la adquisición de identidad anterior o posterior en una célula implica que todas las células descendientes de ésta tendrán la misma identidad que la célula madre (revisado en Lawrence y Struhl, 1996). La adquisición de identidad anterior (A) o posterior (P) se da antes incluso de que se formen los primordios que darán lugar a los discos imaginales (Fig. 3A).

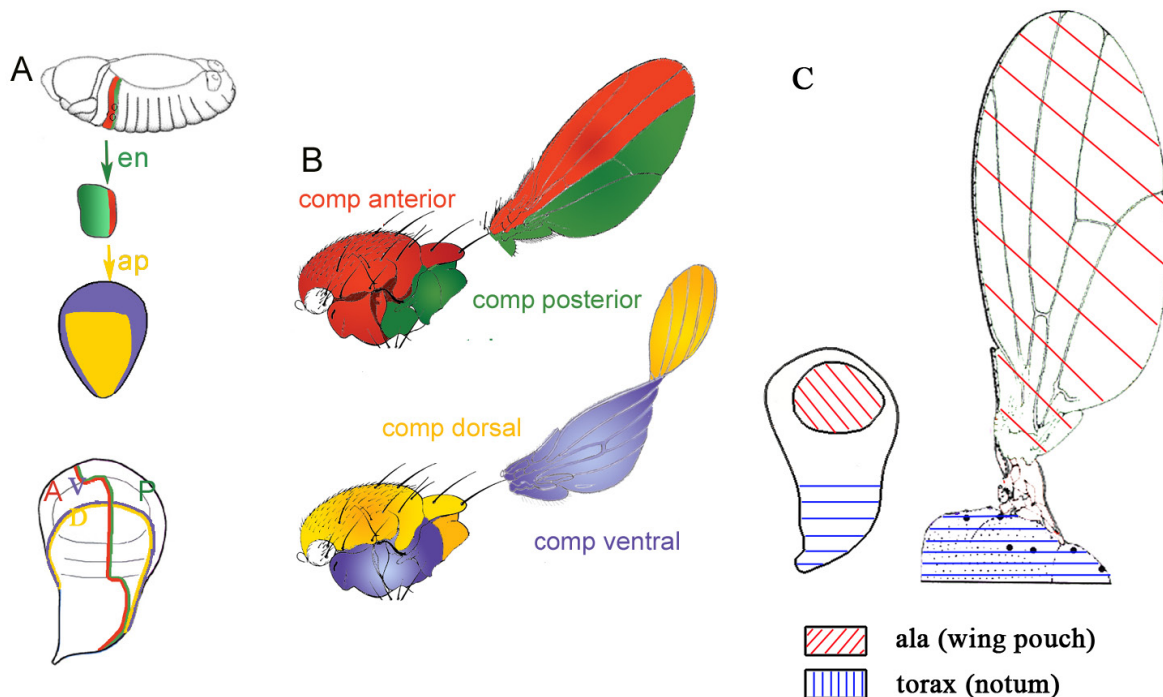


Figura 3. Formación de compartimentos en el disco imaginal de ala.

A) La división entre anterior y posterior se produce por la expresión temprana de *en* en el compartimento posterior. La división entre Dorsal y Ventral se produce más tardíamente mediada por la expresión de *ap* en el territorio dorsal. B) Correspondencia de los compartimentos larvarios con las estructuras adultas. C) Territorio presuntivo de ala y notum en disco imaginal y su equivalencia en adulto. Cedido por Silvia Aldaz.

El mecanismo por el cual se adquiere una identidad u otra es simple. En función de la localización de las células en el embrión, estas expresan *engrailed* (*en*), pasando a quedar definidas como células posteriores, o no lo expresan, quedando marcadas estas células como anteriores. Es por tanto un sistema binario basado en señales encendido/apagado (Morata y Lawrence, 1975); revisado por (Mann y Morata, 2000). La sola expresión de *en* en el compartimento anterior provoca el cambio de identidad anterior a posterior. De manera recíproca, la inhibición de *en* en el compartimento posterior conlleva que esas células cambien

su identidad a anteriores (Garcia-Bellido y Santamaria, 1972; Morata y Lawrence, 1975; Tabata y Kornberg 1993). La pertenencia a un compartimento anterior o posterior genera una afinidad específica en las células lo que impide que células de uno y otro compartimento se mezclen. Aproximadamente en el segundo estadio larvario se produce en el disco imaginal de ala una segunda segregación territorial con la aparición de los compartimentos dorsal (D) y ventral (V) (Fig. 3B). Al igual que con los compartimentos anteriores y posteriores, esta división es un sistema binario encendido/apagado. El gen responsable de otorgar identidad dorsal a las células es *apterous* (*ap*) y su ausencia determina a las células como ventrales (Cohen y cols., 1992; Diaz-Benjumea y Cohen, 1993). Aproximadamente al mismo tiempo se establece una tercera división que diferencia células del tórax (*notum*) y células del ala (“wing pouch”) (Fig. 3C), aunque en este caso la restricción de linaje entre los tejidos no es clara (Cavodeassi y cols., 2002; Zecca and Struhl, 2002a, b). La confrontación de células con distinto linaje que se da en el borde A/P es esencial para el crecimiento de los discos imaginales ya que a partir de este borde se forma lo que se conoce como centro organizador del tejido. Los centros organizadores son capaces de dirigir e integrar la formación de patrón y el crecimiento en todo el disco ya que emiten unas proteínas difusibles o morfógenos que difunden por todo el tejido. En este sentido, el caso más estudiado ha sido el del disco de ala. Debido a la aposición de células anteriores y posteriores en el borde A/P se genera un morfógeno llamado *decapentaplegic* (*dpp*) (Basler y Struhl, 1994; Guillen y cols., 1995; Zecca y cols., 1995) y en el borde D/V se produce otro conocido como *wingless* (*wg*) (Zecca y cols., 1996). Estos morfógenos difunden formando un gradiente, por lo que las células del disco recibirán una cantidad distinta de morfógeno en base a su situación en el disco. El nivel de concentración de morfógeno que percibe cada célula determinará qué genes activa y le permitirá además conocer su situación en el disco con respecto al organizador. El control de este gradiente ha de ser muy preciso para evitar aberraciones; existen experimentos que muestran que las células que no son capaces de responder adecuadamente a la concentración de Wg o Dpp, entran en apoptosis o muerte celular (Adachi-Yamada and O’Connor, 2002). Se ha propuesto que la eliminación de estas células es debida a la detección de discontinuidades en el gradiente de los morfógenos, quizás a través de diferencias en la afinidad celular. Este mecanismo correctivo permite la eliminación de células con una identidad distinta a la que corresponde a su localización en el tejido (Adachi-Yamada y cols., 1999; Adachi-Yamada and O’Connor, 2002). Un claro ejemplo de esto se da con el gen de respuesta a Dpp, *spalt* (*sal*). *sal* se expresa en la zona central del disco de ala como respuesta a altas concentraciones de Dpp. La sobreexpresión de *sal* en células de la zona lateral del disco, donde *sal* no se encuentra activado de manera natural, desemboca en la eliminación de estas células, que sin embargo son perfectamente viables cuando se localizan en la zona central del disco, donde las células que las rodean también expresan *sal*. De manera inversa los

clones mutantes para sal no sobreviven en la zona central del disco y sin embargo son viables en las zonas laterales donde las células no expresan sal (Milan y cols., 2002). Esto implica que las células son capaces de conocer su identidad y de comunicarse entre ellas para causar la eliminación de aquellas células que tengan una identidad inadecuada. Como veremos más adelante este comportamiento se puede asimilar al fenómeno de competición celular que se describe a continuación.

Competición celular.

A mediados de los años 70, se descubrió otro proceso que también implicaba comunicación entre distintos tipos de células y que conducía a la muerte de uno de ellos. En este caso la muerte tampoco se producía como consecuencia de un programa preestablecido en un lugar determinado sino como respuesta al contexto concreto en el que se encuentra una célula. El fenómeno fue originalmente descrito en experimentos que alteraban la dosis de genes *Minute* presentes en las células imaginales (Morata and Ripoll, 1975). Los mutantes homocigóticos *Minute* son letales, sin embargo las larvas mutantes heterocigóticas $M^{+/-}$ son perfectamente viables y fenotípicamente normales, siendo su única diferencia con las células normales que muestran un retraso en el desarrollo debido a una disminución de la proliferación celular de manera autónoma celular (Fig 4A). El retraso en la proliferación se ha explicado por el hecho de que los genes *Minute* codifican para proteínas ribosómicas por lo que la reducción de la dosis de estas proteínas en las moscas heterocigóticas limita la capacidad de síntesis proteica de las células. Sin embargo estas mismas células $M^{+/-}$ que son viables y capaces de formar un individuo adulto viable, son eliminadas cuando están rodeadas de células silvestres (con una tasa de proliferación normal). Además, la intensidad de la competición celular aumenta de manera proporcional a la diferencia en la tasa de proliferación entre las células $M^{+/-}$ y M^{+} (Simpson and Morata, 1981). Ya que las células $M^{+/-}$ son viables, su desaparición se debe a la interacción con las células silvestres (Morata and Ripoll, 1975; Simpson and Morata, 1981). Se ha realizado el experimento recíproco, en el que se generan clones M^{+} (con una tasa de proliferación normal) en un fondo $M^{+/-}$ (con baja tasa de proliferación). También aquí se observa que los clones M^{+} ocupan largas extensiones de tejido (Morata y Ripoll, 1975) y que las células $M^{+/-}$ que rodean al clon están siendo eliminadas (Li and Baker, 2007; Martin y cols., 2009; Simpson and Morata, 1981) (Fig. 4B y C).

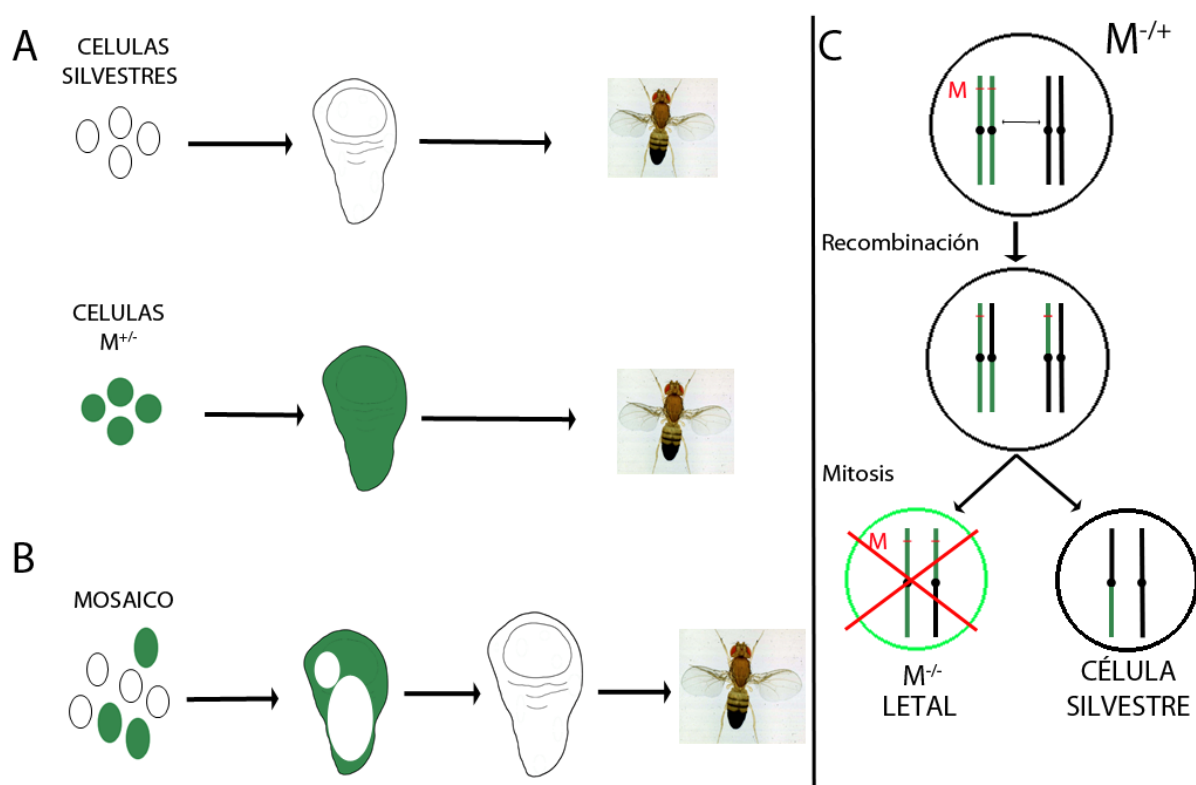


Figura 4. Comportamiento de células silvestres en fondo $M^{-/-}$.

A) Las células $M^{-/-}$ a pesar de tener un metabolismo más lento que las células silvestres, son capaces de formar individuos adultos perfectamente viables aunque tardan en desarrollarse dos días más aproximadamente. B) Los clones silvestres en un fondo $M^{+/-}$ proliferan más que las células $M^{+/-}$, acaban ocupando todo el disco y causan apoptosis en las células silvestres que las rodean. C) Mecanismo por el cual se producen clones de células silvestres en fondo $M^{+/-}$. La recombinación mitótica en una célula $M^{+/-}$ da como resultado una célula hija *Minute* homocigótica que muere y otra célula silvestre.

A este fenómeno se le denominó competición celular. Sin embargo, no basta la cercanía de las células para que se produzca la competición celular, ya que está no ocurre a través de compartimentos (Simpson y Morata, 1981). Experimentos más recientes demostraron que los clones $M^{+/-}$ en fondo wt muestran activación de la ruta apoptótica, como se aprecia en las tinciones con TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end-labelling) que indica degradación de DNA, característica propia de células que están en la fase final de la cascada apoptótica. Asimismo, estas células muestran activación de la ruta apoptótica JNK (Moreno y cols., 2002). Estas células expresan también altos niveles de brinker y bajos niveles de la forma fosforilada de Mad, lo que indicaría una incapacidad a la hora de transducir la señal de Dpp. Esta incapacidad para transducir Dpp se ha propuesto como posible causa del inicio de la apoptosis por competición celular. Podríamos definir por tanto la competición celular como el proceso que tiene lugar

cuando dos células viables interactúan y a causa de esa interacción una de ellas muere. La competición celular, al igual que los cambios en la identidad celular, pone de manifiesto el importante papel del contexto y de la comunicación celular en el control de la apoptosis.

La competición celular no sólo ocurre entre células con diferente dosis de genes *Minute*. Se ha demostrado que diferentes niveles de dMyc en las células también dispara el fenómeno de competición celular. Las células que tienen niveles bajos de dMyc, a pesar de ser viables, cuando se encuentran rodeadas de células con niveles normales de dMyc entran en apoptosis y también muestran activación de la ruta JNK (de la Cova y cols., 2004; Moreno and Basler, 2004). En este caso, al contrario que en el caso de los mutantes *Minute*, también se vio que no sólo son eliminadas las células que tienen menos dosis de dMyc de lo normal, sino que incluso células silvestres son eliminadas cuando están en contacto con células que expresan mayores niveles de dMyc. En este caso, a las células capaces de eliminar por competición celular a células silvestres se les denomina supercompetidoras. También se ha visto que los clones que expresan altos niveles de dMyc en comparación con las células que les rodean son capaces de crecer hasta ocupar grandes áreas del disco, causando muerte en las células silvestres que están en contacto con el clon. Se ha especulado que la competición celular tendría funciones como mantener la robustez del tejido eliminando a las células menos aptas o ejercer un control sobre el tamaño de los órganos (de la Cova y cols., 2004; Moreno and Basler, 2004; Moreno y cols., 2002). Sin embargo, otros experimentos ponen en duda el papel de la competición celular en el control del tamaño (Martín y cols., 2009)

Aparte de dMyc se ha descubierto que otra vía implicada en proliferación (la vía de Hippo) también es capaz de causar competición celular y su desregulación permite a las células adquirir características de supercompetidoras. Los clones que tienen la vía de Hippo inhibida proliferan más que las células silvestres que las rodean y de hecho son capaces de eliminarlas (Tyler y cols., 2007).

En mamíferos también se han observado indicios de la existencia de competición celular. Células de ratón con una sola copia del gen *belly spot and tail (bst)* tienen una menor tasa de proliferación (al igual que los genes *Minute*, *bst* también afecta a proteínas ribosómicas) y son eliminadas cuando están en cultivo con células silvestres (Oliver y cols., 2004). También hay experimentos al respecto en hígado de rata, en el que se vio que células fetales con una mayor tasa de proliferación, cuando eran trasplantadas a hígados en proceso de regeneración, acababan ocupando gran parte del hígado regenerado y esto iba acompañado de una mayor apoptosis de los hepatocitos silvestres del mismo tejido (Oertel y cols., 2006). Esto indica que, posiblemente, el fenómeno de competición celular sea un proceso conservado entre *Drosophila* y vertebrados.

Apoptosis en *Drosophila*.

La muerte celular, al igual que la proliferación, es necesaria para la formación de un individuo y fallos en su regulación suelen degenerar en enfermedades en prácticamente todos los organismos. En *Drosophila*, los individuos mutantes en genes necesarios para la muerte celular no sobreviven más allá de estadio embrionario (White y cols., 1994), lo que pone de manifiesto la enorme importancia de la muerte celular en el desarrollo. Un tipo de muerte celular es la conocida como apoptosis o muerte celular programada. La apoptosis es un mecanismo interno desarrollado por las propias células y que conduce a su destrucción (Kerr y cols., 1972). Es un proceso normal durante el desarrollo del organismo y se requiere para mantener la homeostasis de los tejidos. Algunas de las funciones que desempeña la apoptosis son la eliminación de estructuras no necesarias, el mantenimiento del número de células o la eliminación de células anormales o dañadas. La capacidad de regular adecuadamente la apoptosis es una necesidad fundamental de las células, por eso las rutas que conducen a la activación de la apoptosis deben estar bajo un control estricto para evitar la entrada espontánea de las células en apoptosis. Por otro lado, como ya hemos dicho anteriormente, durante el desarrollo normal de *Drosophila* se requiere que ciertas células sean eliminadas, por lo que también es importante que el sistema sea lo suficientemente plástico como para responder adecuadamente a estos requerimientos. Para una regulación tan precisa, las células deben constar de rutas que sean capaces de reconocer esos estímulos apoptóticos y transmitir la información al interior de la célula para ejecutar la respuesta más adecuada a los requerimientos del organismo. Esta regulación de la apoptosis es especialmente importante en el proceso de formación de un tumor ya que una de las características distintivas de las células cancerosas es su habilidad para evadir los mecanismos que conducen a la apoptosis (Hanahan and Weinberg, 2000).

Regulación y ejecución de la apoptosis.

Los experimentos realizados en *C. elegans* llevaron al descubrimiento de la existencia de una base genética en el fenómeno de la apoptosis (Ellis and Horvitz, 1986). La búsqueda de mutantes defectivos en apoptosis en dicho organismo condujeron a toda una cascada de genes implicados en el proceso apoptótico, aunque el verdadero valor de este experimento es la homología que tiene esta cascada en todos los metazoos. Esta vía apoptótica consta de genes pro y anti apoptóticos que se activan de manera secuencial para desencadenar el proceso apoptótico. Toda esta cascada desemboca en la activación de una familia de proteasas

conocidas como caspasas. Una vez activadas, las caspasas proceden a la proteólisis de los distintos componentes celulares lo que conduce a la muerte de la célula. Las caspasas que llevan a cabo la proteólisis de los sustratos celulares se denominan caspasas efectoras y se encuentran presentes en la célula de manera normal en forma de pro-enzimas inactivas. Estas caspasas efectoras son activadas mediante proteólisis por otro tipo de caspasas conocidas como caspasas iniciadoras que se activan en respuesta a estímulos apoptóticos. En *Drosophila* se han caracterizado cinco caspasas diferentes. Al grupo de las caspasas iniciadoras pertenecen Dronc y Dredd mientras que Dcp-1, Drice y Decay forman parte del grupo de las caspasas efectoras (revisado en (Hay and Guo, 2006). (Fig. 5).

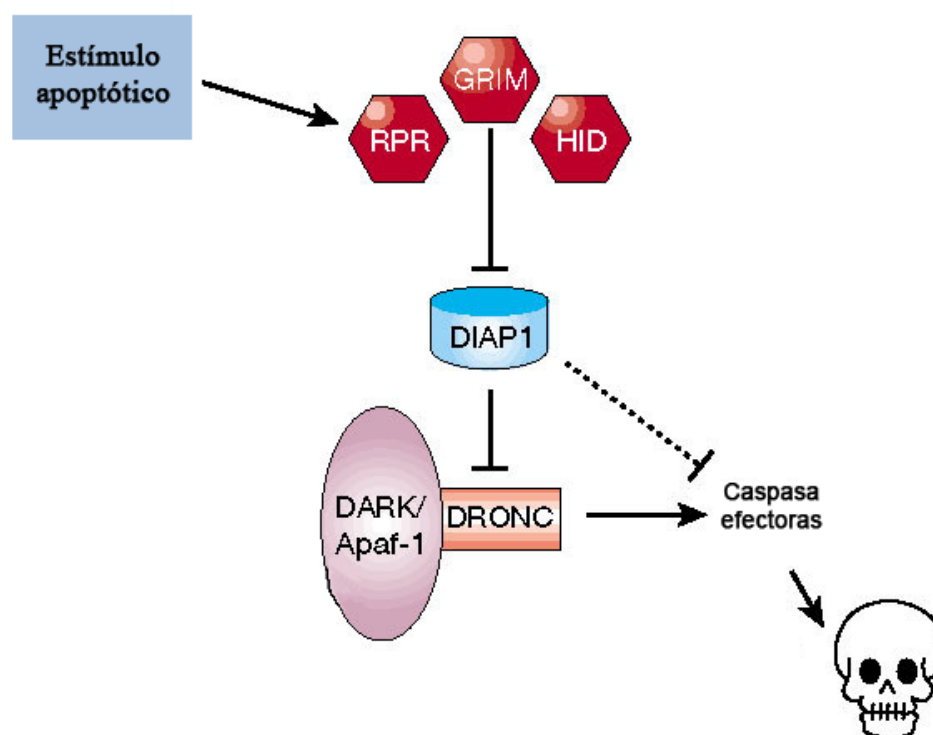


Figura 5. Cascada apoptótica en *Drosophila melanogaster*.

Los genes proapoptóticos *rpr*, *hid* y *grim* se unen e inactivan al gen anti apoptótico *diap1*. Una vez inactivado *Diap1*, el apoptosoma, complejo formado por *Dark* y *Dronc* es capaz de activar a las caspasas efectoras *Drice*, *Dcp1* y *Decay*. Tomado de Meier y cols., 2000.

Sin embargo la actividad de las caspasas se encuentra finamente regulada por proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas. Entre las pro-apoptóticas se encuentran *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*), *grim*, *sickle* (*skl*) y *jafrac2*. Cuando estos genes se activan son capaces de interactuar e inhibir a las proteínas anti-apoptóticas IAPs ("Inhibitor of Apoptosis Proteins"). En *Drosophila* existen dos representantes de la familia IAP: *DIAP1* y *DIAP2*.

Estas proteínas se encuentran de manera constitutiva bloqueando la capacidad catalítica de las caspasas iniciadoras y efectoras. La simple mutación de las proteínas IAPs lleva a la muerte en embrión de la mosca debido a apoptosis masiva, mientras que su sobreexpresión protege a la mosca de apoptosis inducida por Rpr, Hid y Grim (Goyal y cols., 2000).

La vía de la c-Jun N-terminal Kinasa (JNK)

La vía JNK es una importante ruta de señalización implicada en la respuesta apoptótica, aunque se ha demostrado que sólo algunos tipos de apoptosis están mediadas por JNK. Le da el nombre una de las proteínas involucradas en la transmisión de esta señal: c-Jun N-terminal Kinasa (JNK). JNK es una ruta celular pleiotrópica que está implicada en procesos tan diferentes como migración celular, proliferación, diferenciación, respuesta inflamatoria, regeneración o apoptosis (Bosch y cols., 2005; Igaki y cols., 2006; Kanda and Miura, 2004; Kuranaga y cols., 2002; Wu y cols., 2010). En *Drosophila*, se ha estudiado el papel de JNK en apoptosis inducida por situaciones de estrés. Por ejemplo la irradiación con rayos X de larvas y embriones provoca la activación de JNK, que a su vez activa *reaper* (*rpr*), lo que finalmente termina con la muerte por apoptosis de las células (McEwen and Peifer, 2005). También juega un papel central en la regulación de la apoptosis por competición celular (de la Cova y cols., 2004; Moreno and Basler, 2004; Moreno y cols., 2002) o cuando hay discontinuidad en la recepción de señales de Wg o Dpp (Adachi-Yamada y cols., 1999; Adachi-Yamada and O'Connor, 2002). En *Drosophila*, a diferencia de en mamíferos, sólo existe un gen que codifique para JNK, el gen *basket* (*bsk*). Esto elimina la redundancia y por lo tanto facilita el estudio de la vía. *Bsk* actúa como sustrato para la quinasa Hemipterous (Hep) (JNKK), que a su vez tiene varios activadores “upstream”, quinasas (JNKKK) como dTAK1, DASK1 o dMekk1. Estas JNKKK serán activadas por diferentes GTPasas dependiendo del estímulo. Finalmente varios receptores de membrana como son Wengen, Frizzled y PVR, los encargados de activar la ruta JNK en base a estímulos del exterior (Fig. 6). La activación de la ruta JNK lleva finalmente a la activación por parte de Bsk de los factores de transcripción Jun y Fos (Riesgo-Escovar y cols., 1996; Zeitlinger y cols., 1997), los cuales proceden a la activación de diversos genes entre los que se encuentra un regulador negativo de la vía, *Puckered* (*puc*). En mamíferos, las proteínas JNK están codificadas por tres genes distintos, *jnk1*, *jnk2* y *jnk3*, cuyos niveles de expresión varían en los diferentes tejidos. En fibroblastos de ratón se ha visto que la falta de *jnk1* y *jnk2* lleva consigo una disminución de la proliferación y resistencia a apoptosis causada por irradiación (Tournier y cols., 2000). De la misma manera, la sobreexpresión de algún componente de ruta JNK en estos mismos fibroblastos desencadena la respuesta apoptótica. (revisado por (Weston and Davis, 2002)

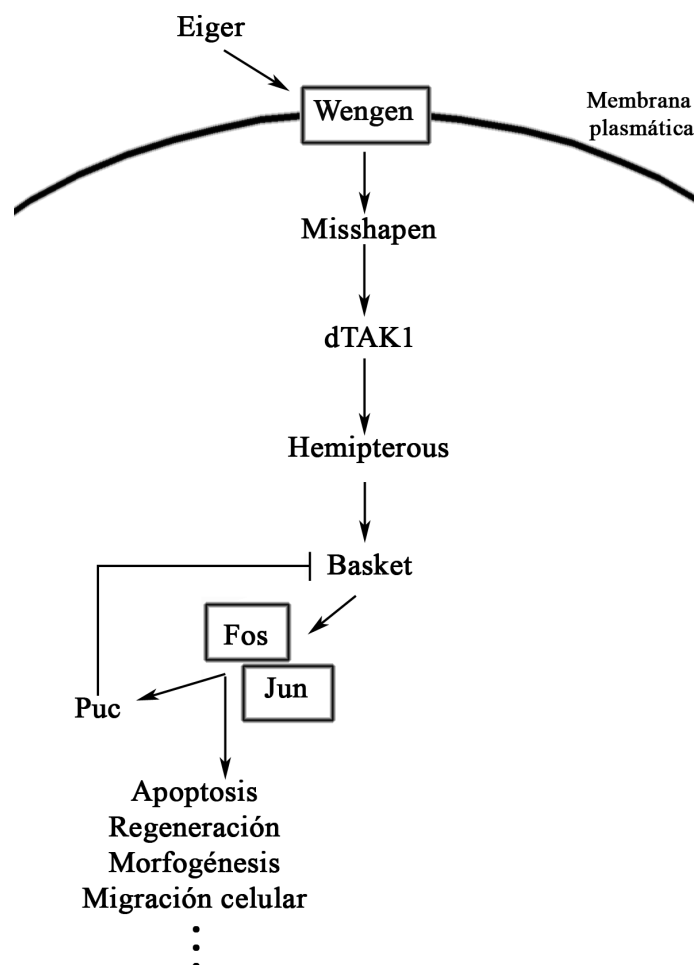


Figura 6. Componentes de la vía JNK.

La ruta JNK media respuestas a diversos estímulos y está implicado en procesos como apoptosis o migración celular. Uno de los transmisores de esos estímulos es el ligando Eiger que se une específicamente al receptor Wengen desencadenando la activación secuencial de varias quinasas. Finalmente Basket activa a los factores de transcripción Fos y Jun que entre otros genes provoca la transcripción de *puc*, un regulador negativo de la vía.

***Drosophila* como modelo de cáncer.**

La regulación de la apoptosis, al igual que la regulación de la proliferación y la diferenciación, juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis en los organismos. Así, muchas enfermedades están causadas por fallos en las vías de señalización implicadas en el desarrollo normal de los organismos. Un ejemplo de esto sería el cáncer. Los diferentes tipos de cáncer en mamíferos aparecen en tejidos con características muy diferentes e implican rutas de

señalización distintas en cada caso. Sin embargo, todos los tumores comparten una serie de características comunes. Entre otras características, estas células son capaces de evadir la apoptosis, crecen de manera incontrolada y no son capaces de responder a los estímulos de parada de proliferación (Hanahan and Weinberg, 2000). Además de estas propiedades intrínsecas de las células tumorales, se ha visto que la interacción de estas células con el ambiente que las rodea juega un papel crucial a la hora de proteger a las células tumorales de los ataques del sistema inmune y de promover su crecimiento (Bissell and Radisky, 2001). Si bien es cierto que quizás *Drosophila* no es el organismo más adecuado para estudiar algunas de las características de los tumores como puede ser la angiogénesis, en otros casos, como el estudio de la relación de un tumor con su ambiente o la capacidad de un tumor para evadir la apoptosis, *Drosophila* puede resultar una herramienta muy potente. De hecho, puede aportar luz en aspectos en los que otros modelos no resultan tan apropiados. Las distintas herramientas generadas para la manipulación de *Drosophila* nos permiten generar clones de células tumorales rodeadas de células que permanecen silvestres. Esto nos permite estudiar las fases más tempranas de la aparición de un tumor, prácticamente cuando está formado por una sola célula, y seguir todo el proceso de progresión tumoral hasta la colonización del disco imaginal. Estas células mutantes pueden inducirse bien por pérdidas de función génica, bien por ganancias de función o por una combinación de ambas. Las pérdidas de función han sido posibles gracias a la vasta colección de mutaciones generadas a lo largo del estudio con *Drosophila* y han permitido el hallazgo de genes supresores de tumores; la eliminación de genes supresores de tumores da lugar a sobrecrecimientos en las células (Gateff, 1978; Gateff and Schneiderman, 1969). Por otro lado, la aplicación del sistema Gal4-UAS (sistema de transcripción de levadura) en *Drosophila* (Brand and Perrimon, 1993) ha permitido realizar ganancias de función de oncogenes que también dan lugar a sobrecrecimientos. Recientemente el uso de recombinación FRT/FLP (Xu and Rubin, 1993) con el sistema MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) (Lee and Luo, 1999) ha permitido la obtención de clones en los que se combinan mutaciones en genes supresores de tumores con ganancias de función de distintos oncogenes (Brumby and Richardson, 2003; Pagliarini and Xu, 2003), consiguiendo de esta manera aproximarse a una situación más fisiológica en la que un grupo de células tumorales rodeadas de células silvestres proliferan hasta invadir todo el tejido.

Rutas implicadas en la formación de tumores en *Drosophila*.

Toda esta metodología ha permitido el estudio de distintas rutas implicadas en la formación de tumores en humanos y en *Drosophila*. A continuación se describen brevemente algunos de las rutas genéticas involucradas en la producción de tumores en *Drosophila*.

Ruta de polaridad apico-basal.

Esta ruta fue una de las primeras que se relacionó con la formación de tumores en *Drosophila*. Está formada por los genes *lethal giant larvae (lgl)*, *scribble (scrib)* y *disc large (dlg)*. Sus productos forman parte de un complejo proteico encargado de regular la polaridad apico-basal de las células epidérmicas. El complejo formado por *scrib*, *dlg* y *lgl*, junto con el complejo Par y el complejo Crumbs, son los encargados de regular la polaridad apico-basal en las células epiteliales (ver revisión de Humbert y cols., 2008; Wodarz and Nathke, 2007) (Fig. 7).

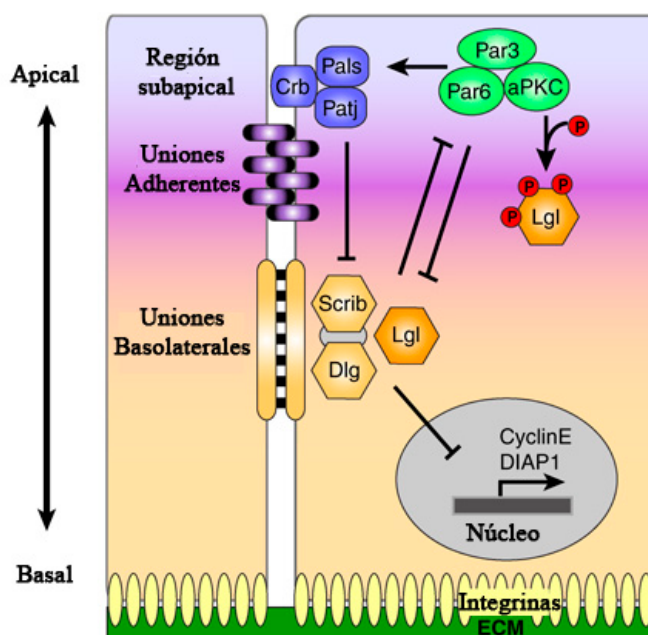


Figura 7. Polaridad apico-basal en *Drosophila melanogaster*.

El complejo que forman *Dlg*, *Scrib* y *Lgl* se asocia a las uniones basolaterales y contribuyen a mantener eje apico-basal polarizado. *Lgl* inhibe a la proteína aPKC restringiendo su localización a las regiones subapicales de la célula. De manera recíproca la proteína aPKC fosforila a *Lgl*. Esta fosforilación inhibe su función y mantiene a *Lgl* en regiones baso-laterales, donde interactúa con *Scrib* y *Dlg*. Tomado de Humbert y cols., 2008.

lethal giant larvae (lgl) fue uno de los primeros genes supresores de tumores que se descubrieron en *Drosophila*, durante una búsqueda de mutaciones que en homocigosis ocasionaban la formación de tumores neoplásicos (Gateff, 1978; Gateff and Schneiderman, 1969). La capacidad ilimitada de crecimiento de estos tumores fue comprobada mediante el trasplante de discos imaginales mutantes a abdómenes de hembras silvestres: se comprobó que en estos abdómenes los tumores continuaban desarrollándose y formaban tumores secundarios en el organismo hospedador (Woodhouse y cols., 1998).

A pesar de esta capacidad invasiva, los clones mutantes rodeados de células silvestres son eliminados del tejido (Agrawal y cols., 1995). La similitud de los fenotipos causados por *scrib*, *dlg* y *lgl*, así como las interacciones observados entre ellos apuntan a que forman parte de la misma ruta de señalización (Bilder y cols., 2000).

Ruta endocítica.

La búsqueda de nuevos genes supresores de tumores llevó al descubrimiento de que muchos componentes de la ruta endocítica se comportan como tales (Lu and Bilder, 2005; Moberg y cols., 2005; Thompson y cols., 2005; Vaccari and Bilder, 2005). La ruta endocítica se requiere para mantener la homeostasis en la concentración y localización de proteínas transmembrana, lo que implica la internalización de porciones de membrana plasmática. Esto se realiza en varios pasos y en todos ellos se han encontrado genes supresores de tumores. Como ejemplo de ello tenemos *vps25* que, al igual que *lgl*, provoca tumores neoplásicos cuando todo el tejido es mutante (causando asimismo la ausencia de pupación), pero cuando se generan clones mutantes estos son eliminados del tejido (Herz y cols., 2006; Thompson y cols., 2005; Vaccari and Bilder, 2005). La diferencia con *lgl* es que los clones *vps25^{-/-}* inducen crecimiento no autónomo en las células silvestres que rodean al clon mientras que en el caso de clones *lgl^{-/-}* no se ha observado este fenómeno. Las mismas observaciones se han hecho para otros componentes de la ruta endocítica como son *avalanche* (*avl*) o *erupted* (*ept*). (Lu and Bilder, 2005; Moberg y cols., 2005).

Debido a la similitud de los fenotipos mutantes tanto de la ruta endocítica como de la ruta de la polaridad diversos autores han sugerido que estas dos vías podrían estar interconectadas, ya que la manipulación de una de las vías lleva consigo la desregulación de la otra vía (revisado por (Vaccari and Bilder, 2009). De hecho los homólogos de *lgl* en levadura promueven el crecimiento mediante la modificación del tráfico vesicular a través de las proteínas del complejo exocítico y proteínas Snare (revisado en Hariharan and Bilder, 2006).

Ruta de Hippo

Entre las distintas rutas que producen sobrecrecimientos también destaca la vía de Hippo. Esta se descubrió primero en *Drosophila* y posteriormente se comprobó que está conservada en mamíferos (Dong y cols., 2007; Huang y cols., 2005). De un tiempo a esta parte, el estudio de esta ruta está recibiendo cada vez más atención debido a la cantidad de estímulos que parece integrar y a su implicación en gran número de procesos (Fig. 8). Recientes estudios

han relacionado la polaridad apico-basal con el control de la vía de Hippo (Chen y cols, 2010; Grzeschik y cols., 2010; Ling y cols., 2010; Robinson y cols., 2010). Fat (Ft) y Dachshous (Ds), dos genes con papel en la polaridad planar, se han identificado también como integrantes en la vía de Hippo (Bennett and Harvey, 2006; Cho y cols., 2006; Silva y cols., 2006). De manera reciente, varios grupos han estudiado su posible implicación también en regeneración (Grusche y cols., 2011; Sun e Irvine, 2011). En *Drosophila*, la inhibición de la vía de Hippo está asociada a sobrecrecimientos hiperplásicos (Huang y cols., 2005).

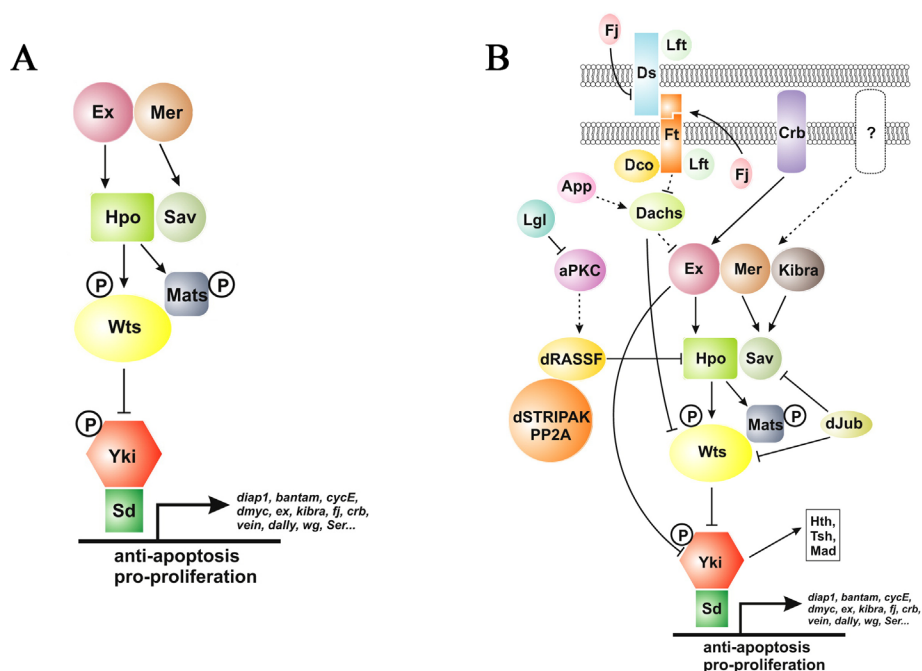


Figura 8. Ruta de Hippo en *Drosophila*.

A) Representación simplificada de la ruta de Hippo. Expanded y Merlín activan la cascada de kinasas formada por los genes supresores de tumores *Hpo*-*Sav* y *Wts*-*Mts*. La activación de estos últimos provoca la inactivación del oncogén *Yki*. *Yki* promueve la proliferación celular y la activación de genes anti-apoptóticos. B) La vía de *Hpo* actúa como un cuello de botella y regula e integra información de distintas vías de señalización. Las protocadherinas *Ft* y *Ds* relacionan Hippo con la polaridad planar. *Crbs* y *Lgl* también parecen regular polaridad apico-basal e *Hpo*. La ruta de Ras se regula con *Hpo* vía *dRASSF*. Modificado de Pan, 2010.

Los primeros componentes de la vía se descubrieron en una búsqueda de genes supresores de tumores (Xu y cols., 1995). El núcleo central de esta vía está formado por los genes *hippo* (*hpo*), *salvador* (*sav*) y *warts* (*wts*). La pérdida de función de cualquiera de estos genes da lugar a una sobreproliferación del tejido mutante. Esto se observa en clones mutantes en discos imaginales, ya que éstos proliferan más rápidamente que las células silvestres que los rodean (Justice y cols., 1995; Tapon y cols., 2002). Además estas células mutantes muestran

cierta resistencia a la apoptosis, lo que unido a su mayor proliferación podría explicar su capacidad para formar tumores hiperplásicos. Hpo y Sav se encargarían de producir la fosforilación de Wts, mediante la ayuda de la proteína “andamio” Mats. Wts, a su vez, sería el encargado de fosforilar al cofactor de transcripción Yorkie (Yki) impidiendo su translocación al núcleo (Huang y cols., 2005). Cuando Yki no es fosforilado se transloca al núcleo y ahí, junto al cofactor Scalloped (Sd), promueve la transcripción de diferentes genes promotores del crecimiento e inhibidores de apoptosis, como son *ciclina E* (*cycE*), *dIAP1*, el micro RNA bantam y *dMyc* entre otros (Goulev y cols., 2008; Wu y cols., 2008; Zhang y cols., 2008).

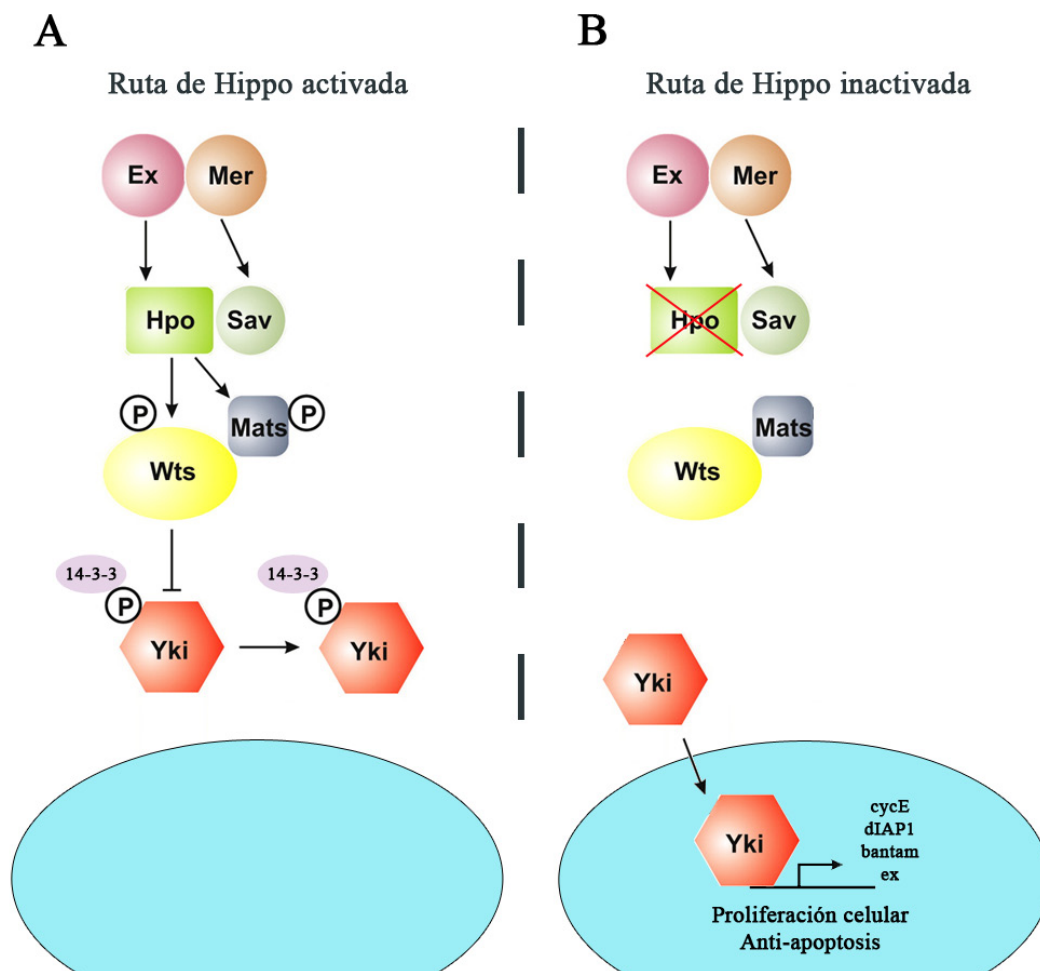


Figura 9. Estado activado e inactivado de la ruta de Hippo.

A) La activación de la ruta de Hpo produce la fosforilación de Yki en unas serinas determinadas. Éstas son reconocidas por las proteínas 14-3-3 que se unen a ellas e impiden la entrada de Yki al núcleo y por lo tanto la promoción de proliferación celular y la inhibición de la apoptosis. B) Cuando la vía de Hpo está inactivada Yki no es fosforilado lo que permite que entre al núcleo donde promueve la transcripción de genes implicados en proliferación celular como *cycE* o *bantam* y de genes anti-apoptóticos como *dIAP1*. Modificado de Pan, 2010.

Por lo tanto cuando la vía de Hippo está activa, Yki es fosforilado y no se transloca al núcleo (Fig. 9A), no produciéndose aumento de proliferación. Por el contrario cuando la vía de Hippo está inhibida la consiguiente translocación de Yki al núcleo promueve proliferación. (Fig. 9B). En mamíferos la inhibición la vía conlleva también un aumento de tamaño de los órganos (Dong y cols., 2007) y se ha comprobado que está implicada en la formación de distintos tumores (Kosaka y cols., 2007; Tapon y cols., 2002; Zhou y cols., 2009).

Células “no-muertas”

Otra desregulación que da lugar a sobrecrecimientos es la que se produce como consecuencia de la secreción de señales mitogénicas que causan proliferación de manera no autónoma celular. Un ejemplo paradigmático de este proceso es el que tiene lugar en el caso de la generación de las llamadas células “no-muertas”. Este proceso tiene lugar cuando a células que están recibiendo estímulos para entrar en apoptosis, por ejemplo a consecuencia de un estrés, se les impide completar el proceso de muerte celular. Esto se consigue inhibiendo la actividad de las caspasas efectoras mediante la sobreexpresión de la proteína viral p35 (Hay y cols., 1995). Las células pasan entonces a un estado de no-muertas en el que la ruta apoptótica está continuamente activada (aunque sin poder ejecutarla, por lo que permanecen vivas indefinidamente). En este estado, las células no-muertas expresan de manera ectópica *wg* y *dpp*, dos importantes morfógenos implicados en la formación de patrón y en la proliferación en *Drosophila* (Huh y cols., 2004; Perez-Garijo y cols., 2004; Ryoo y cols., 2004). Esta expresión ectópica también ocurre en células apoptóticas normales (sin impedir la apoptosis sobreexpresando p35), pero debido a la rapidez con la que desaparecen las células tras recibir el estímulo apoptótico, esta expresión es difícil de observar. Se ha propuesto que las señales mitogénicas emitidas por las células apoptóticas podrían ser responsables de la compensación proliferatoria que permitiría reemplazar a las células que han sido eliminadas del tejido. En cambio, cuando se generan células “no-muertas”, las señales proliferatorias siguen siendo emitidas durante un largo periodo, lo que provoca el sobrecrecimiento de las células silvestres que rodean al clon. Wg y Dpp, dos de las señales emitidas por células “no-muertas”, estarían implicadas en la formación de estos sobrecrecimientos que eventualmente degeneran en tumores hiperplásicos (Perez-Garijo y cols., 2004; Perez-Garijo y cols., 2009).

Capacidad tumorigénica de *lethal giant larvae*.

scrib, *dlg* y *lgl*, codifican para proteínas citoplasmáticas asociadas a la membrana plasmática. Mientras *Scrib* y *Dlg* se encuentran localizadas en dominios baso-laterales, principalmente asociadas a uniones septadas (revisado en Bilder, 2004; Hariharan and Bilder, 2006), *Lgl* se encuentra distribuida más ampliamente a lo largo del dominio apico-basal. La exacta localización de *Lgl* depende de su estado de fosforilación. *Lgl* es susceptible de ser fosforilada por aPKC, una proteína del complejo Par, que se encuentra localizada apicalmente (Betschinger y cols., 2003; Yamanaka y cols., 2003). La fosforilación de *Lgl* por aPKC inhibe la unión de *Lgl* a la membrana plasmática y, dado que aPKC se localiza en dominios apicales, *Lgl* queda restringida a dominios baso-laterales, donde se piensa que es reclutada por *Scrib* y *Dlg* (Bilder y cols., 2000). Se sabe que las larvas homocigóticas para las mutaciones *lgl* contienen tumores en los discos imaginales y en el cerebro (Gateff, 1978; Gateff and Schneiderman, 1969). Sin embargo, en otros organismos *lgl* también ha sido implicado en la formación de tumores. En humanos *lgl* tiene dos homólogos: *hugl1* y *lgl2*. Ratones knock-out para *hugl1* muestran sobreproliferación de los neuroblastos (Klezovitch y cols., 2004). Además este gen se encuentra inhibido en diferentes tumores de mamífero como melanomas, cáncer colorrectal o cáncer de endometrio (Kuphal y cols., 2006; Schimanski y cols., 2005; Tsuruga y cols., 2007). También otros miembros del complejo como *dlg* y *scrib* están implicados en la formación de tumores en mamíferos (Frese y cols., 2006; Ouyang y cols., 2010).

Por otra parte, Las larvas mutantes *lgl* continúan proliferando durante 12-13 días, cuando las normales terminan el crecimiento a los 5-6 días. Estas larvas mutantes alcanzan un gran tamaño hasta el momento de su muerte y de ahí el nombre de la mutación. (Fig. 10). Estudios realizados en disco de ojo de *Drosophila* muestran que mutantes de estos genes aumentan la expresión de *cyc E* que es un regulador del paso G1-S del ciclo celular, lo que quizás facilita que las células mutantes entren en ciclo de división más rápidamente (Brumby y cols., 2004). Sin embargo las causas por las que estas mutaciones dan lugar a tumores todavía son motivo de estudio y es uno de los objetivos de esta tesis, así como el comportamiento de células individuales mutantes cuando están rodeadas por tejido normal.

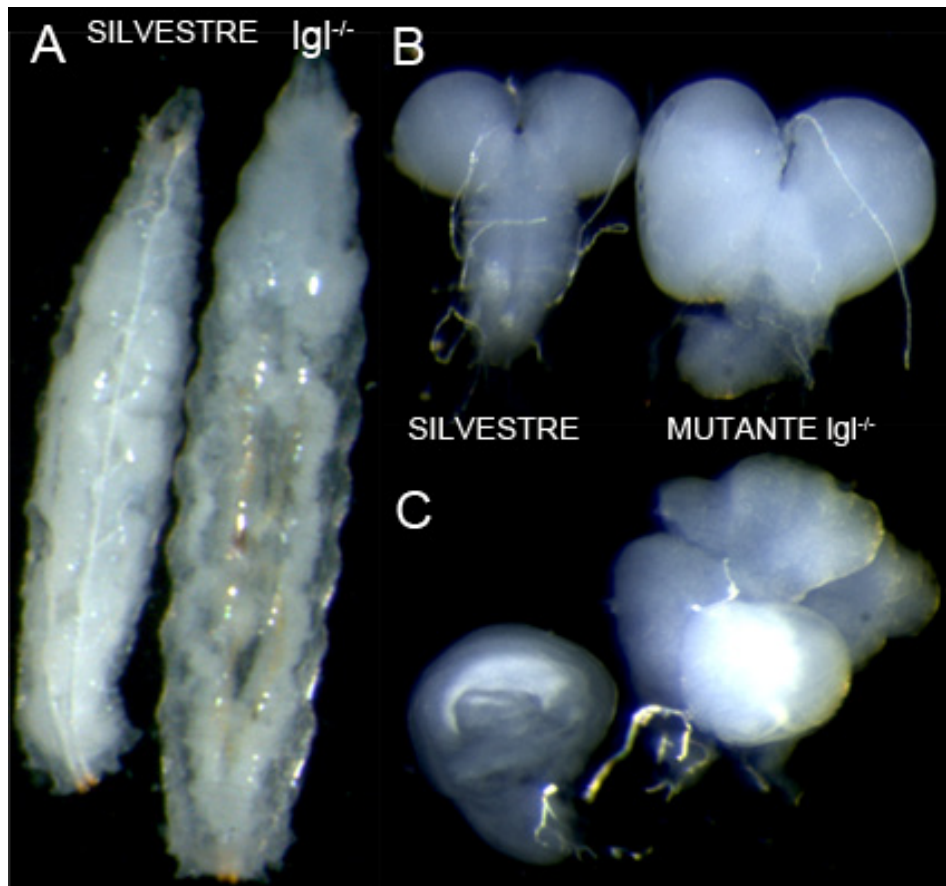


Figura 10. Comparación de tejidos silvestres y tejidos mutantes para *lgl*.

A) Tamaño comparado entre una larva silvestre y una larva mutante para *lgl*. Las larvas *lgl*^{-/-} alcanzan gran tamaño y adquieren un aspecto transparente. B) En los mutantes *lgl* los lóbulos ópticos y el VNC adquieren gran tamaño y son capaces de invadir otros tejidos. C) Discos imaginales de ala. En los discos mutantes *lgl* se observa una morfología aberrante y en ocasiones se producen fusiones con el disco de halterio o el disco imaginal de pata 3. Imágenes cedidas por Manuel Calleja.



II.OBJETIVOS

Esta tesis pretende profundizar en el proceso de formación de tumores en *Drosophila melanogaster* y en el papel de la competición celular en la formación y desarrollo de éstos. Para averiguarlo se abordaron los siguientes objetivos específicos:

Estudio de la tasa de proliferación de las células mutantes *lgl* y comparación con la tasa de proliferación de las células silvestres.

Formación y desarrollo de células tumorales *lgl*^{-/-} UASRas^{V12} en un contexto *lgl*⁺.

Papel de la competición celular en la formación de tumores.

Papel de la ruta de Hippo en el desarrollo de tumores *lgl*^{-/-} UASRas^{V12}.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo.

Todas las estirpes utilizadas así como los cruces requeridos en esta tesis se realizaron en medio de cultivo estándar y en cámaras de incubación a una temperatura constante de 25 °C y 75% de humedad relativa del aire.

Estirpes de moscas y metodología.

Toda la información relativa a las estirpes de moscas utilizadas en esta tesis se encuentra en la dirección web: <http://flybase.org/>.

Alelos mutantes.

Para la realización de esta tesis se utilizaron los siguientes alelos nulos:

*Igl*⁴ / CyO; Este alelo mutante para *Igl* ha sido el utilizado durante toda la tesis y ha sido caracterizado como nulo (Mechler y cols., 1985).

*scrib*¹ / TM6B; Los experimentos relativos a *scrib* se realizaron con este alelo, anteriormente utilizado en otros trabajos para generar clones tumorales (Brumby and Richardson, 2003).

dronc^{l29} / TM6B; Este alelo ha sido caracterizado (Xu y cols., 2005) y su mutación en homocigosis se caracteriza por ser resistente a apoptosis. Se utilizó por tanto en los experimentos en los que realizaron clones tumorales en un fondo genético defectivo para apoptosis.

Líneas Gal4 y UAS.

El sistema Gal4/UAS es un sistema de expresión génica perteneciente a levaduras. Su uso en *Drosophila* permite la expresión dirigida de genes que estén bajo control de secuencias UAS (“Upstream Activating Sequence”) (Brand and Perrimon, 1993). El activador transcripcional Gal4 reconoce y se une a estas secuencias UAS promoviendo la transcripción (Fig. 11).

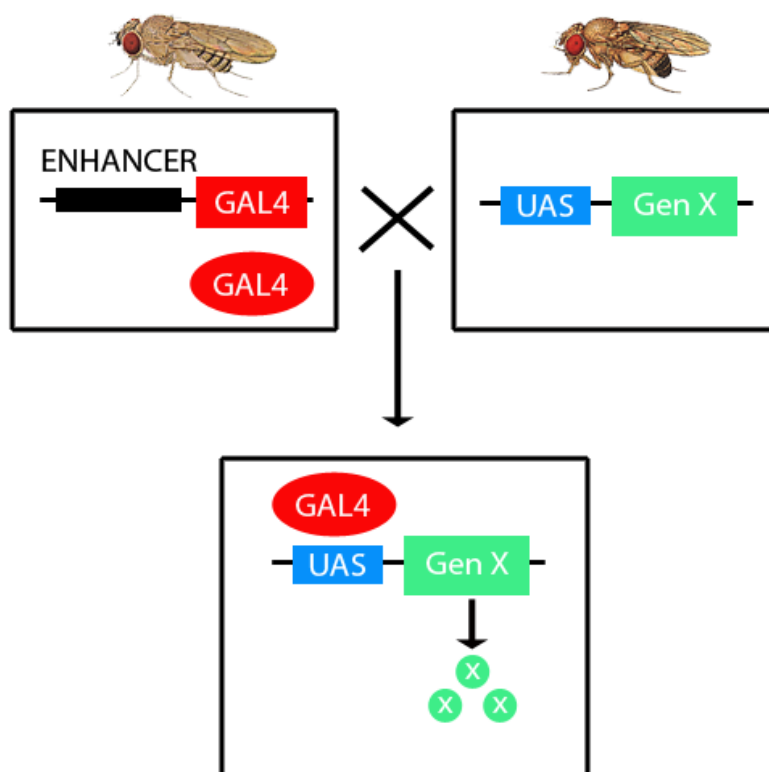


Figura 11. Sistema de expresión génica Gal4 / UAS.

La expresión del gen Gal4 está dirigida bien por un promotor insertado por nosotros, bien por el “enhancer” de un gen endógeno del cual copia su patrón de expresión espacio-temporal. Las líneas Gal4 utilizadas en esta tesis han sido tubulina-Gal4 (tub-Gal4), *hedgehog*-Gal4 (*hh*-Gal). Las líneas UAS utilizadas han sido UASFlp, UASRas^{V12}, con la cual conseguimos que la vía de Ras se encontrará constitutivamente activa (Barbacid, 1987), UAS*Puc*, UASp35, UASYki (cedido por Kenneth Irvine), UASHippo.

Líneas Lacz.

Para analizar el nivel de transcripción de diferentes genes, se utilizaron estirpes en las que se insertaba en el locus de genes de interés el gen bacteriano lacz. Estas estirpes son *diap1-lacz*, *engrailed-lacz* (*en-lacz*) y *puckered-lacz* (*puc-laz* o *puc*^{E69}).

Generación de clones

Para la realización de los clones se utilizó la técnica de la recombinación mitótica mediada por Flipasa/FRT (Xu and Rubin, 1993). Con esta técnica proveniente de levadura, la recombinación se produce entre secuencias FRT (“Flipase Recombination Target”) localizadas en la misma posición de cromosomas homólogos. Esta recombinación está mediada por la recombinasa “Flipase” (Flp).

Comparación del tamaño de un clon mutante con su clon gemelo.

En este experimento se realizaron clones mutantes para *lgl* y clones gemelos *lgl*⁺ surgidos de un mismo evento mitótico utilizando la técnica de recombinación mitótica mediada por Flp/FRT. En este caso la actividad de la Flp se encontraba dirigida por el promotor de una “heat shock protein” (hs-Flp), lo que nos permitía controlar el nivel de actividad de la Flipasa mediante choques térmicos a 37°C. En este caso los choques térmicos fueron de 7 minutos. El genotipo de las larvas utilizadas en este experimento fue *yw hs-Flp122; lgl⁴ FRT40A / ubiGFP FRT40A*. Los clones mutantes para *lgl* están marcados por falta de GFP, mientras que los clones gemelos llevan doble dosis de GFP. (Fig. 12).

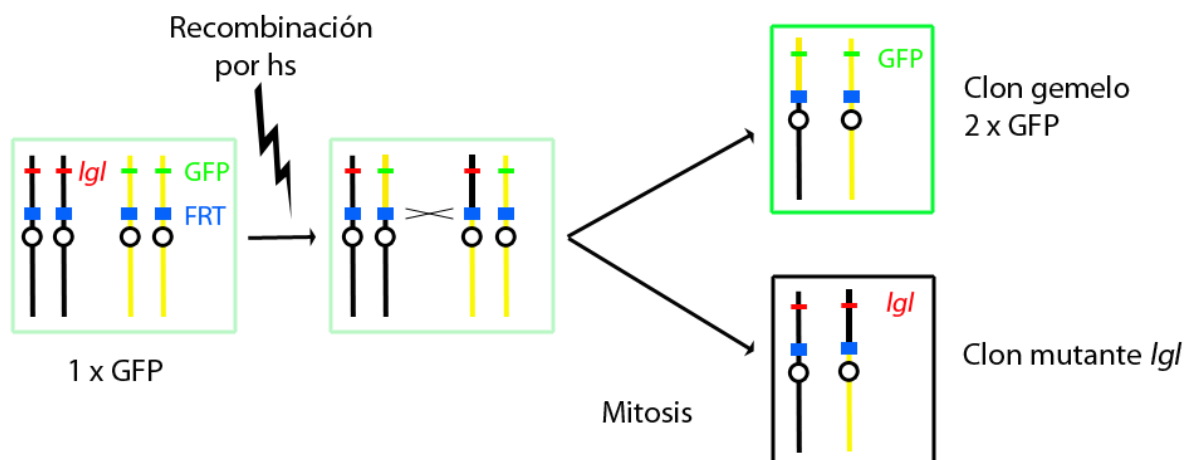


Figura 12. Experimento por el cual se genera un clon mutante y un clon gemelo.

La célula madre de la que se originan los dos tipos de clones tiene un cromosoma homólogo con una dosis de GFP y otro cromosoma que porta la mutación que queremos estudiar. La recombinación entre cromosomas homólogos está mediada por la recombinasa flipasa, que se activa por choque térmico. Al segregarse los cromosomas en la mitosis se produce una célula que porta dos dosis de GFP y otra célula mutante homocigótica y marcada por falta de GFP.

Compartimentos mutantes para *lgl*.

Combinando las técnicas de recombinación mitótica Flp/FRT con el sistema Gal4/UAS se obtuvieron compartimentos posteriores mutantes para *lgl*, mientras los compartimentos anteriores permanecían como control *lgl*⁺ mediante el método desarrollado por Martín y Morata, 2006. Para ello activamos la Flipasa sólo en el compartimento posterior bajo el control de *hedgehog* (*hh*), recombinando un cromosoma que lleva un alelo mutante *lgl* con otro que lleva un alelo mutante *Minute*. Se producen dos tipos de clones, mutantes homocigóticos *lgl* por un lado y mutantes homocigóticos *Minute* por otro. Debido a que los clones mutantes homocigóticos *Minute* son letales, al cabo de un tiempo todo el compartimento posterior estará formado exclusivamente por células mutantes para *lgl*. El genotipo de las larvas utilizadas fue: *yw*; *M(2L)24F ubiGFP FRT40A /lgl⁴ FRT40A* ; *hh-Gal4 UASFlp*. Los compartimentos posteriores quedan marcados por falta de GFP.

Clones mutantes para *lgl*.

Los clones mutantes para *lgl* se realizaron usando el sistema MARCM (“Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker”) (Lee and Luo, 1999). Una vez más se combina la técnica de recombinación mitótica Flp/FRT con el sistema Gal4/UAS pero se añade la expresión de Gal80, una proteína que se une específicamente a Gal4 inhibiendo su actividad. Mediante el sistema MARCM se puede estudiar el comportamiento de clones mutantes para un gen que simultáneamente sobreexpresan otro. Con este sistema se realizaron los clones mutantes para *lgl*, y también los clones mutantes para *lgl* que a la vez sobreexpresan otros genes. El genotipo de las larvas con clones mutantes para *lgl* fue: *yw hs-Flp tub-Gal4 UASGFP ; lgl⁴ FRT40 / tub-Gal80 FRT40A*. El genotipo de las larvas con clones *lgl*^{-/-} en los que se sobreexpresaba Ras^{V12} fue: *yw hs-Flp tub-Gal4 UASGFP ; lgl⁴ FRT40A / tub-Gal80 FRT40A; UASRas^{V12}*.

Los clones se realizaron con choques térmicos a 37°C de 7 o 15 minutos, siempre 48-72 horas AEL.

Clones mutantes para *scrib*.

Para realizar clones mutantes para *lgl* que sobreexpresan Ras^{V12} se siguió un protocolo similar al que usamos con los clones *lgl*^{-/-}. El genotipo de estas larvas fue: *yw hs-Flp tub-Gal4 UASGFP ; UASRas^{V12} ; scrib¹ FRT82B / tub-Gal80 FRT82B*. En este caso el choque térmico fue de 30 minutos, también 48-72 horas AEL.

Inmunohistoquímica.

Las larvas se diseccionaron en PBS en hielo durante 20 minutos. Se fijan 30 minutos en paraformaldehído 4% con 0,1% de DOC y Tritón X-100. Se realizan 3 lavados con PBS al 1% con Albúmina de Suero Bovina (BSA). Se incuba con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente y se lava cuatro veces con PBS al 1% de BSA. Los discos se montaron en Vectashield (Vector Company, Inc).

Para detectar células en división se usaron marcadores de diferentes fases del ciclo celular. La incorporación de Bromo-desoxiUridina (BrdU) durante la fase S del ciclo celular. Se siguió fue el protocolo estándar. También se usó el anticuerpo anti-PH3 que marca la fase M del ciclo celular.

Los anticuerpos utilizados fueron en esta tesis fueron: anti-caspasa 3 activada (conejo) 1:50 (Cell Signalling Technology), anti-Histona 3 fosforilada (conejo) 1:100 (Cell Signalling Technology), anti- β Galactosidasa (ratón) 1:50 (Hibridoma Bank), anti-*Engrailed* (ratón) 1:20 (Hibridoma Bank), anti-*Yorkie* (conejo) 1:200 (cedido por Kenneth Irvine), anti-p35 (conejo) 1:5000 (Stratagene).

Los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo están disponibles en Invitrogen.

Adquisición y tratamiento de imágenes.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se realizaron en un microscopio Leica TCS SPE o Zeiss LSM510. Para las mediciones de área de clones se utilizó el programa “Wright Imaging Cell Facility ImageJ” y las gráficas y estadística posterior se realizaron con el programa Microsoft Office Excel 2007.

IV. RESULTADOS

Compartimentos mutantes para *lgl* forman tumores neoplásicos.

El comportamiento del tejido mutante para *lgl* ha sido estudiado con anterioridad (Gateff, 1978; Gateff and Schneiderman, 1969). Se sabe que las larvas mutantes homocigóticas para *lgl* no son capaces de pupar y permanecen en el medio de cultivo en fase larvaria III durante 12 o 13 días. A su vez se observan tumores neoplásicos tanto en el sistema nervioso central como en los discos imaginales (Fig. 13A-C).

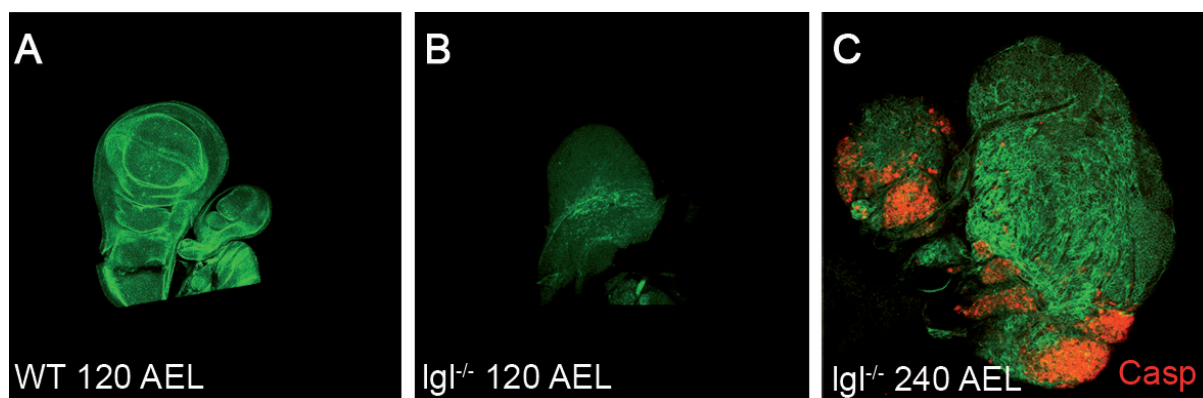


Figura 13. Desarrollo de discos y compartimentos *lgl*^{-/-}.

A) Disco de ala silvestre tras 5 días de desarrollo. B) Disco de ala *lgl*^{-/-} tras 5 días de desarrollo. El tamaño es menor quizás debido a una apoptosis inicial. C) Tras 10 días de desarrollo los discos imaginales adquieren morfología aberrante y forman tumores neoplásicos. Caspasa 3 activada en rojo.

Sin embargo poco se sabe del patrón de divisiones de estas células a lo largo del desarrollo. Para profundizar en el estudio del ritmo de división de las células *lgl*^{-/-} decidimos hacer el compartimento posterior mutante para *lgl* y comparar su crecimiento con el del compartimento anterior *lgl*⁺. Para ello sobreexpresamos la flipasa sólo en el compartimento posterior (P) valiéndonos del sistema GAL4/UAS y utilizando la línea *hedgehog*-Gal4 (*hh*-Gal4) que dirige la expresión de la proteína Gal4 sólo en este compartimento. De esta manera se producen altos niveles de recombinación mediante FRT sólo en el compartimento posterior. Si la recombinación se da entre un cromosoma mutante para *lgl* y otro cromosoma mutante para un gen *Minute* (*M*) se pueden producir dos tipos de células en el compartimento posterior (ver materiales y métodos). Por un lado células mutantes homocigóticas *lgl* (marcadas por falta de GFP) y por otro lado células hermanas mutantes homocigóticas para la mutación *M* (marcadas por la expresión de dos dosis de la proteína GFP). La mutación *M* es letal celular en homocigosis por lo que al cabo de un tiempo el compartimento posterior estará formado exclusivamente por células *lgl*^{-/-}. Estas larvas con un compartimento mutante tienen el mismo fenotipo que el que se observa cuando toda la larva es *lgl*^{-/-}: las larvas no son capaces de pupar y crecen hasta alcanzar el fenotipo “gigante” tras lo cual mueren. Para medir el crecimiento producido por la falta de *lgl* hemos medido la razón entre los tamaños de los compartimentos posterior (P) y anterior (A) (ratio P/A), a lo largo del desarrollo en discos de ala con un compartimento posterior *lgl*^{-/-} y un compartimento anterior *lgl*⁺. A 144 horas tras el nacimiento de la larva (AEL), el compartimento posterior (mutante para *lgl*) es ligeramente más pequeño que un compartimento posterior silvestre, el ratio P/A es 0,43 (n =18) mientras que en controles de genotipo silvestre es 0,65 (Fig. 14A) (Martín y cols., 2009). Esto se debe en nuestra opinión a los relativamente altos niveles de apoptosis que se observan en el compartimento *lgl* mutante, como indica la actividad caspasa. La cantidad y distribución de la caspasa activada, un indicador de la apoptosis, es variable, pero nunca está asociada al borde del compartimento. Esto sugiere que no se produce interacción entre las células anteriores *lgl*⁺ y las células posteriores *lgl*^{-/-} que conduzca a muerte celular. También es resaltable que el borde antero-posterior se mantiene nítido a lo largo del desarrollo por lo que asumimos que la identidad antero-posterior no se encuentra afectada. A medida que avanzamos en el desarrollo, sin embargo, el compartimento posterior se va haciendo más y más grande en comparación con el anterior. A 168 AEL el ratio P/A es 0,84 (n = 15) y a las 216 horas es 1,25 (n = 10) (Fig. 14B y C).

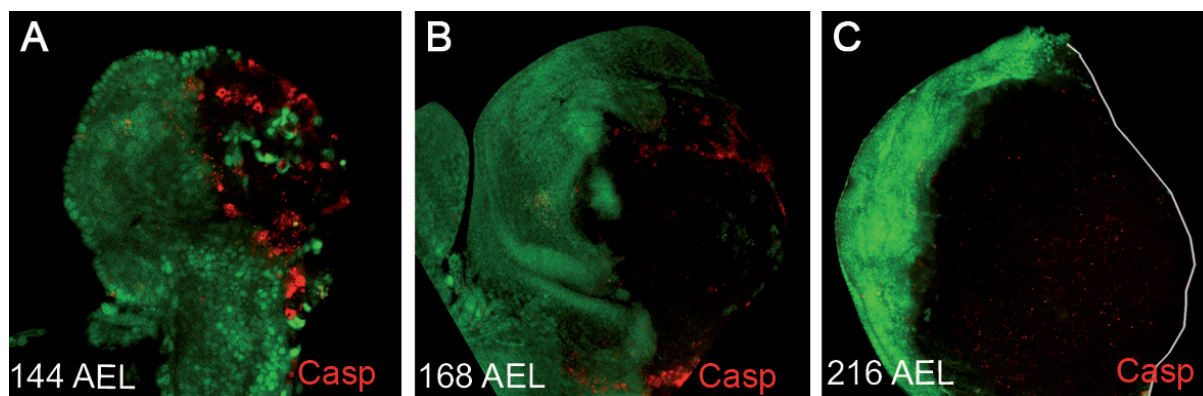


Figura 14. Compartimentos mutantes para *lgl*^{-/-}.

Los compartimentos posteriores mutantes para *lgl* están marcados por falta de GFP. El compartimento anterior sirve como control, ya que permanece *lgl*⁺. A) A 144 AEL el compartimento posterior presenta tinción con anti-Caspasa-3 activa (en rojo) pero no asociada al borde A/P. En las larvas *lgl*^{-/-} también se observa tinción con anti-Caspasa-3 activa, localizada aparentemente de manera aleatoria. El ratio P/A en este caso es menor de lo que correspondería en situación silvestre, probablemente debido a esta caspasa. B) A 168 AEL se aprecia que el compartimento posterior tiene un mayor tamaño de lo normal en situación silvestre. Las células apoptóticas van disminuyendo. C) A 216 AEL, la larva ya debería haber pupado, sin embargo estas larvas continúan en el tercer estadio larvario. El fenotipo es similar al que se observa cuando toda la larva es mutante *lgl*. Los compartimentos posteriores mutantes están muy sobrecrecidos en comparación con el compartimento anterior *lgl*⁺.

Las tinciones tanto con Bromo-desoxiUridina (BrdU) (agente intercalante que marca la fase S del ciclo celular) como con PH3 (marcador de la fase M) arrojaron un resultado interesante. No muestran una diferencia evidente entre la proliferación de los compartimentos A y P en estadios tempranos (144 AEL) (Fig. 15A-A').

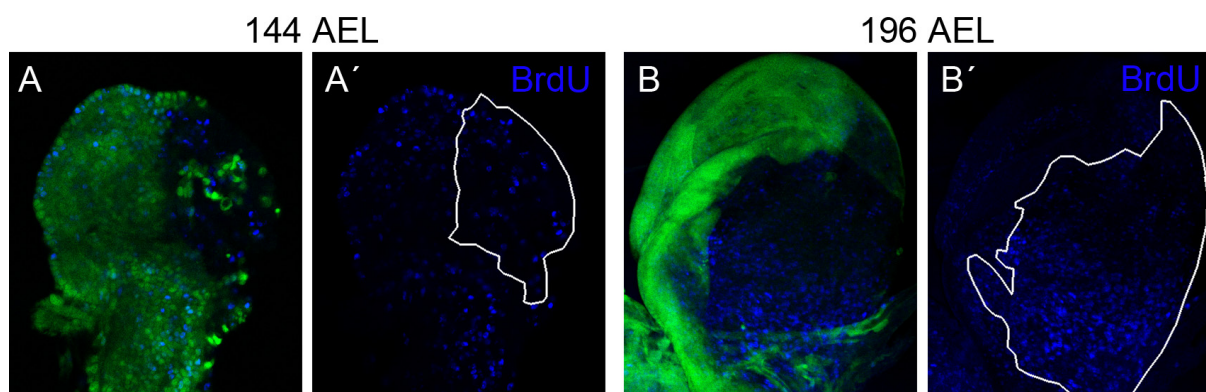


Figura 15. Compartimentos mutantes para *lgl*^{-/-}.

A-A') Los compartimentos posteriores mutantes para *lgl* (marcados por falta de GFP) muestran la misma tasa de proliferación que los compartimentos anteriores *lgl*⁺ a 144 AEL. B-B') A medida que el disco avanza en el desarrollo los compartimentos anteriores frenan su proliferación mientras que el compartimento posterior sigue proliferando.

En estadios más tardíos (196 AEL) se observa que mientras que el compartimento anterior ha dejado de proliferar el compartimento posterior continúa proliferando al mismo ritmo (Fig. 15B-B'). Esto explicaría el mayor tamaño de los compartimentos posteriores a 216 horas AEL. Estos resultados nos llevan a sugerir que las células *lgl*^{-/-} crecen al mismo ritmo de división que las células silvestres. La diferencia es que no son capaces de responder al mecanismo que dicta que el órgano ha llegado al tamaño final y continúan creciendo hasta la muerte de la larva. Esto podría explicar la capacidad tumorigénica de las células *lgl*^{-/-}.

Clones mutantes para *lgl* son eliminados por competición celular.

Como hemos visto anteriormente, y como otros autores han demostrado, el tejido mutante para *lgl* forma tumores neoplásicos en los cuales se producen fusiones entre discos imaginales, metástasis hacia otros tejidos y eventualmente la muerte de la larva (Gateff, 1978; Gateff and Schneiderman, 1969) tras un periodo larvario anormalmente largo. De estos experimentos se desprende que las células *lgl*^{-/-} son viables y tienen el potencial para formar tumores. Estos experimentos, sin embargo, no son la mejor aproximación a la hora de estudiar la formación y progresión de un tumor ya que todo el tejido porta la mutación tumoral, cuando generalmente la adquisición de características tumorales se da primero en un pequeño territorio que se encuentra rodeado por tejido silvestre. Para reproducir de la manera más aproximada esta situación hicimos clones mutantes para *lgl* mediante la técnica MARCM. De este modo se obtiene un grupo de células *lgl*^{-/-}, marcadas en verde, rodeadas de células *lgl*⁺. En esta situación observamos no sólo que las células *lgl*^{-/-} ya no son capaces de formar tumores, sino que, además, éstas son eliminadas del disco como demuestran las tinciones con caspasa 3 activa (Fig. 16A-B'). La desaparición gradual de los clones se produce a partir de las 48 horas después del choque térmico que origina el clon (AHS), de una manera más acusada en la región central del disco ("wing pouch") que en el notum, aunque ignoramos la razón para este comportamiento. Sin embargo estos clones del notum también son eliminados finalmente ya que en adulto no observamos ninguna lesión debida a la falta de *lgl*. Además de la actividad caspasa, en estos clones *lgl*^{-/-} que se están muriendo se observa una alta actividad de la ruta JNK, como demuestra el nivel de expresión de *puckered* (*puc*) (Fig. 16C-C').

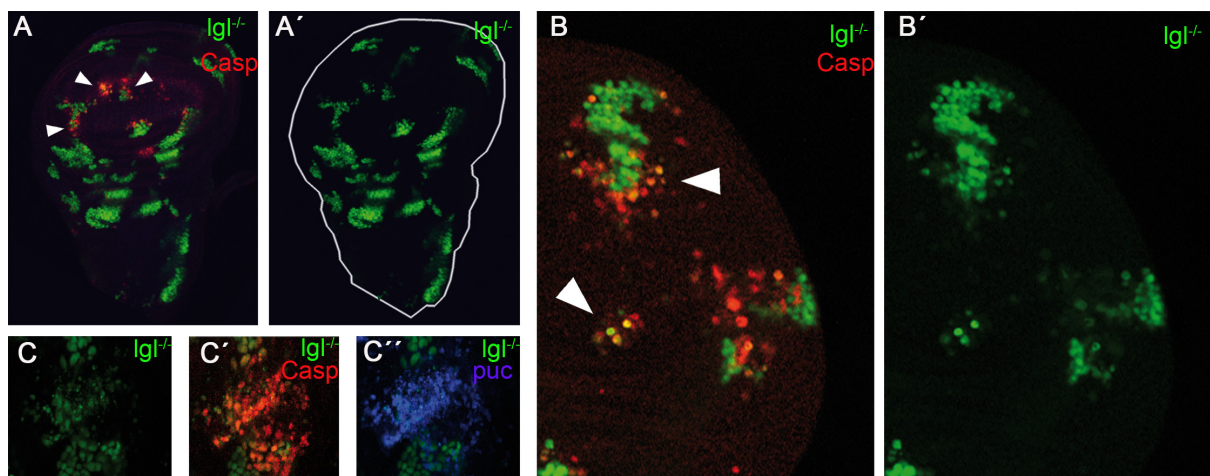


Figura 16. Comportamiento de clones mutantes para *lgl* en un fondo silvestre.

A-A') Los células *lgl*^{-/-}, a pesar de ser viables como demuestran las larvas homocigóticas *lgl*, son eliminadas cuando están rodeadas de células *lgl*⁺, de manera más acusada en la zona central del disco que en la zona del notum, aunque eventualmente todos los clones desaparecen. B-B') La apoptosis en los clones *lgl*^{-/-} se produce en las células mutantes que están en contacto con las células silvestres (observar flechas). C-C') En los clones *lgl*^{-/-} se aprecia que donde aparece tinción con caspasa también hay altos niveles de expresión de *puc*. Esto indica un alto nivel de actividad de la ruta JNK.

puc es un gen que se expresa como resultado de la activación de la ruta JNK y utilizando un stock que tiene inserción de un gen bacteriano lacZ en el locus de *puc* (Martin-Blanco y cols., 1998) podemos medir el nivel de activación de la vía. Tanto las células *lgl*^{-/-} como las células silvestres son viables, sin embargo cuando estos dos tipos de células están en contacto, debido a la comunicación que se establece entre ellas, las células *lgl*^{-/-} son eliminadas. Esta es la definición que antes dábamos de la competición celular. Además, en estos clones la apoptosis se encuentra asociada al borde del clon, justo en las células *lgl*^{-/-} que están en contacto con las células silvestres, reforzando la idea de que esta apoptosis se produce por una interacción entre las células *lgl*^{-/-} y las células silvestres (Fig. 16B-B' ver flechas). La activación de la ruta JNK es también una característica común de los clones eliminados por competición celular, sugiriendo que éste es el mecanismo por el que son eliminados los clones *lgl*^{-/-} (Moreno y cols., 2002).

Clones mutantes para *lgl* en los que se impide la muerte no forman tumores.

Como se ha demostrado anteriormente las células mutantes para *lgl* tienen la capacidad intrínseca para formar tumores. Sin embargo, estas mismas células *lgl*^{-/-} cuando están rodeadas de células silvestres no son capaces de reproducir el fenotipo tumoral debido a que son eliminadas. Nuestro siguiente paso fue comprobar si evitando que estas células *lgl*^{-/-} sean eliminadas, podrían de esta manera recuperar el fenotipo tumoral. Para ello hicimos uso de diferentes herramientas genéticas. Utilizando una vez más el sistema MARCM sobreexpresamos la proteína p35 únicamente en los clones mutantes para *lgl*, lo cual impide que ejecuten la apoptosis, por lo que conseguimos rescatar su viabilidad. Dichos clones adquieren una forma redondeada, indicando una falta de capacidad para integrarse en el tejido adecuadamente, no alcanzan un gran tamaño y son incapaces de formar tumores neoplásicos o invadir el disco (Fig. 17A-A'').

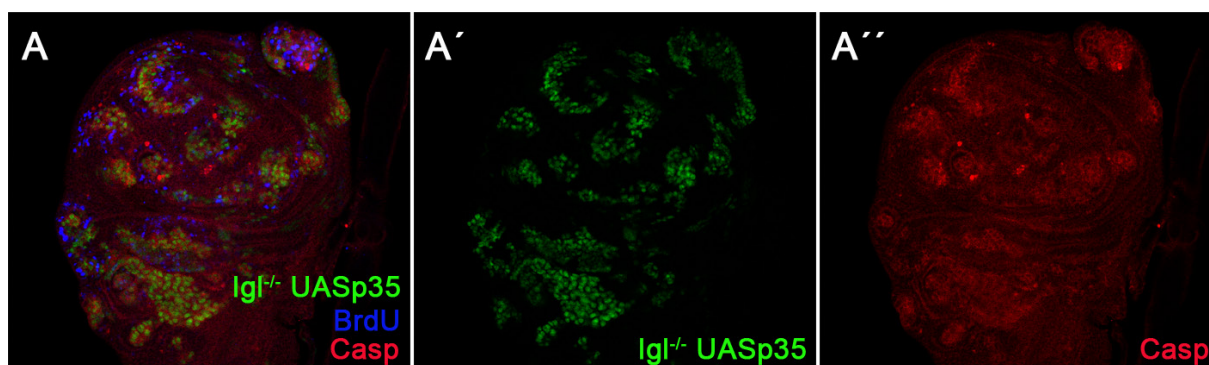


Figura 17. Clones *lgl*^{-/-} protegidos de la muerte mediante la expresión de p35.

A-A'') Los clones *lgl*^{-/-} UASp35 no desaparecen por apoptosis, sin embargo no son capaces de invadir el disco. Debido al efecto de las células no-muertas se produce proliferación de manera no autónoma celular en las células silvestres que rodean al clon como indica la tinción con BrdU (A). La tinción con anti-caspasa muestra que todos los clones, independientemente de su localización en el disco, han iniciado la cascada apoptótica.

Como hemos mencionado con anterioridad, la utilización de p35 conlleva efectos no deseados como es la aparición de células “no-muertas” (Huh y cols., 2004; Perez-Garijo y cols., 2004; Ryoo y cols., 2004). Estas células *lgl*^{-/-} que expresan P35 se mantienen indefinidamente en un estado de no muertas y emiten señales de proliferación, como *Wg* y *Dpp*, dos morfógenos fundamentales en el desarrollo de los discos imaginales, a las células circundantes,. Este efecto queda patente tanto con las tinciones con BrdU (Fig. 17A) como con tinciones con anticuerpo contra la proteína dMyc (no mostrado), en las que se ve que las células silvestres que rodean al clon han aumentado su tasa proliferativa y dan lugar a sobrecrecimientos hiperplásicos.

Una observación significativa en este experimento es que se aprecia caspasa activa en todos los clones (Fig. 17A''), confirmando que todos los clones activan la ruta apoptótica independientemente de si están situados en las zonas presuntivas de notum o ala. Para evitar la aparición de células “no-muertas” en este experimento utilizamos otro modo de impedir la muerte en las células *Igf^{-/-}*: la sobreexpresión de *puc*, un gen de la ruta JNK, que actúa a su vez como regulador negativo de la vía (Martín-Blanco y cols., 1998). La sobreexpresión de este gen impide la muerte de las células mutantes para *Igf* pero no parece suficiente para reproducir el fenotipo tumoral. En este caso, a diferencia de cuando se expresa p35, la morfología de los clones es completamente normal e indica una mejor integración de las células *Igf^{-/-}* con el tejido silvestre circundante (Fig. 18A).

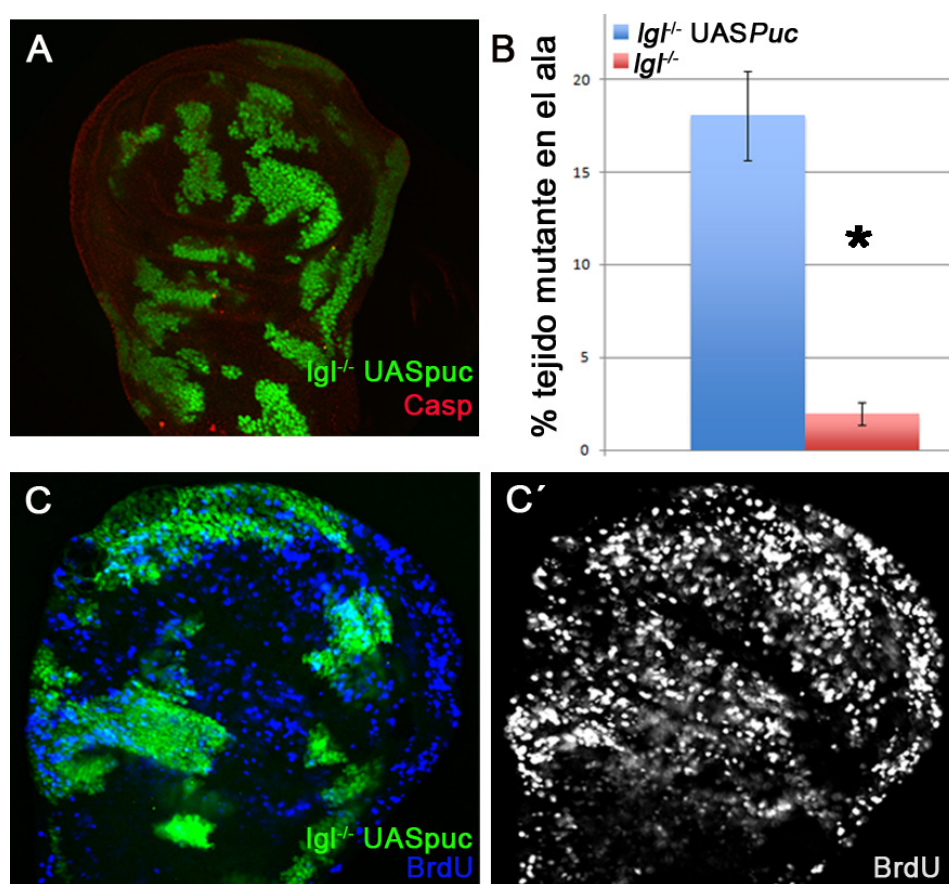


Figura 18. Comportamiento de los clones *Igf^{-/-} UASpuc*.

A) Los clones *Igf^{-/-} UASpuc* no muestran tinción con anti-Caspasa 3 activa y se observa una mejor integración en el tejido que con los clones *Igf^{-/-}*. B) Para ilustrar el rescate de viabilidad que se produce inhibiendo la ruta de JNK en clones *Igf^{-/-}*, se midió el porcentaje de tejido mutante en la zona central del disco de ala * P < 1 x 10⁻⁵. Las barras de error muestran error estándar. C) Las tinciones con BrdU muestran que los clones *Igf^{-/-} UASpuc* proliferan al mismo ritmo que el tejido silvestre que les rodea.

El rescate que se obtiene sobreexpresando *puc* queda patente comparando la cantidad de tejido mutante que queda en la zona central del disco pasadas 72 horas AHS, en discos con clones *lgl^{-/-}* y discos con clones *lgl^{-/-}* que sobreexpresan *puc*. En éstos últimos la cantidad de tejido mutante es 6 veces mayor que en los discos que no están protegidos contra la apoptosis. (Fig. 18B). En este caso las tinciones con BrdU no muestran una mayor proliferación de los clones mutantes (Fig. 18C-C'). El hecho de rescatar los clones sobreexpresando *puc* nos indica que la principal ruta por la cual se activa la respuesta apoptótica en estos clones es la vía JNK.

Los clones *lgl^{-/-}* tienen una tasa de crecimiento normal.

Los ejemplos mejor estudiados de competición celular se dan entre poblaciones de células con un diferente ritmo de división celular. Así es tanto en el caso de las células *Minute* heterocigóticas (Morata and Ripoll, 1975; Moreno y cols., 2002), como en aquellas que tienen menos dMyc que las células adyacentes (De la Cova y cols., 2004; Moreno y Basler, 2004). Nuestro siguiente paso fue determinar la tasa de división de las células *lgl^{-/-}*. Para ello, valiéndonos de la recombinación con FRTs, diseñamos un experimento en el cual, mediante un mismo evento de división celular, obtendríamos un clon de células *lgl^{-/-}* marcadas por falta de GFP, y un clon hermano al que llamaremos gemelo de células *lgl⁺* marcado con 2 dosis de GFP (Fig. 19A-C). Como estos dos grupos de células han sido producidos en el mismo momento la comparación del tamaño que alcanzan nos dará una idea concreta de la tasa de crecimiento que tienen. Realizamos puestas de 24 horas y dimos un choque térmico de 7 minutos a 37 °C para asegurarnos de que obteníamos pocos clones, facilitando así la comparación entre clon mutante *lgl* y su clon gemelo. Comparamos el tamaño de los clones a las 48 y 72 horas tras la inducción de los mismos. A las 48 horas el tamaño del clon *lgl^{-/-}* y del clon gemelo es similar (n = 40 clones en 15 discos) (Fig. 19D) lo que quiere decir que durante las primeras 48 horas las células *lgl^{-/-}* proliferan igual que las células silvestres. Sin embargo, a las 72 horas ya se aprecia una diferencia en el tamaño, siendo el tamaño de los clones *lgl^{-/-}* inferior al de los clones gemelos *lgl⁺* (p = 0,0001; n = 56 clones en 32 discos) (Fig. 19D). Esta diferencia de tamaño coincide con la aparición de caspasa activa en las células *lgl^{-/-}* (Fig. 19A-C).

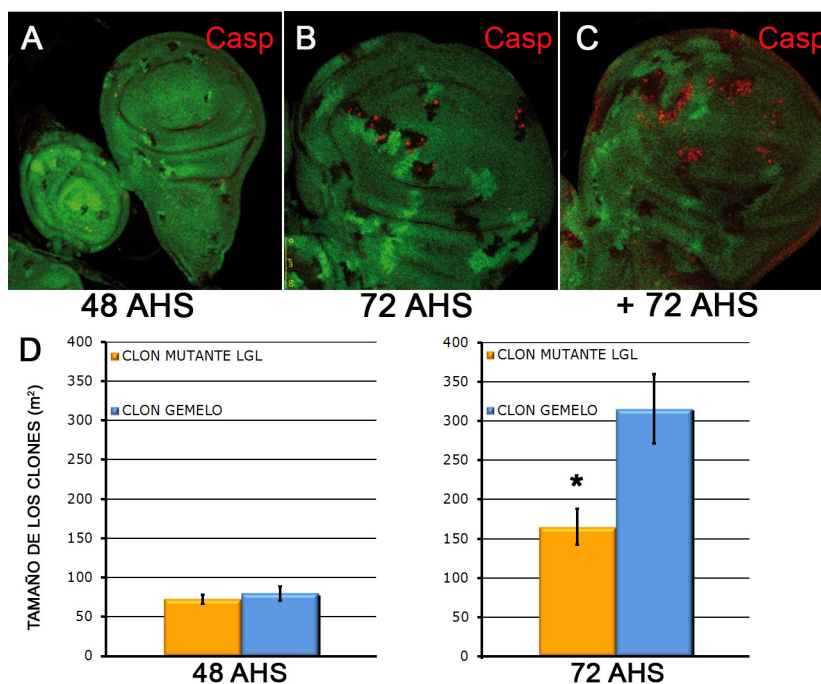


Figura 19. Proliferación de clones mutantes *lgl*.

A-C) Los clones *lgl*^{-/-} están marcados por falta de GFP, mientras que el clon gemelo que se produce en el mismo momento está marcado con dos dosis de GFP. Los clones *lgl*^{-/-} comienzan a mostrar tinción con anti-Caspasa 3 activa alrededor de 72 horas AHS. D) a las 48 horas AHS el área del clon *lgl*^{-/-} y el clon gemelo es prácticamente igual. A las 72 horas AHS el clon *lgl*^{-/-} es más pequeño que el clon gemelo. *P < 0,0001. Las barras de error muestran error estándar.

Creemos que esta diferencia de tamaño es debida simplemente a que las células *lgl*^{-/-} ya han empezado a morir. Para ahondar más en el estudio de la tasa de proliferación de las células *lgl*^{-/-} generamos clones mutantes para *lgl*, silvestres para un gen *Minute*, en un fondo de células *lgl*⁺ pero *M*^{+/-}. Por lo tanto, damos una ventaja proliferativa a los clones *lgl*^{-/-} sobre las células del fondo que proliferan más lentamente. Mirando los clones a las 72 horas AHS observamos que los clones parecen tener mejor viabilidad por lo que indica el tamaño de los clones. Sin embargo estas células siguen mostrando apoptosis (Fig. 20). Estos resultados son coherentes con los mostrados por Froidi y cols., (2010) en los que los clones *lgl*^{-/-} en fondo *M*^{+/-} son eliminados de la zona central del disco. Otro dato que indica que las células *lgl*^{-/-} no se dividen más lentamente son las tinciones con BrdU de los clones *lgl*^{-/-} *UASpuc*, en las que los clones mutantes proliferan al mismo ritmo que las células silvestres que las rodean (FIG 18C-C'). Como hemos visto anteriormente, en compartimentos mutantes para *lgl*, también las tinciones con BrdU y PH3 mostraban una tasa de proliferación similar a la de los compartimentos anteriores *lgl*⁺ (Fig. 15).

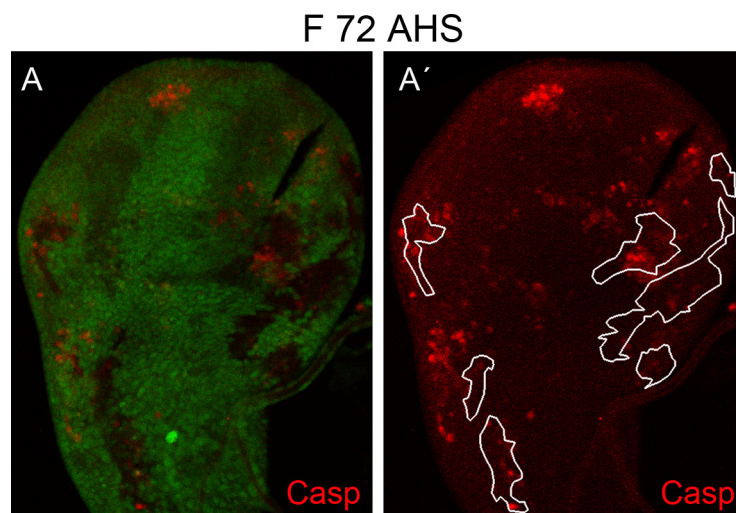


Figura 20. Clones *lgl*^{-/-} en fondo *M*^{+/-}.

Dando ventaja proliferativa a los clones *lgl*^{-/-} generándolos en fondo *M*^{+/-}, éstos no son capaces de formar tumores y de hecho siguen mostrando apoptosis.

Potencial tumorigénico de las células *lgl*^{-/-} que sobreexpresan *Ras*^{V12}.

Ya ha sido establecido anteriormente que los clones *scrib*^{-/-} (que tienen el mismo fenotipo que los clones *lgl*^{-/-} y forma parte del mismo complejo que *lgl*) son capaces de formar tumores neoplásicos invasivos cuando expresan bien la forma constitutivamente activa del oncogén *ras* (*Ras*^{V12}), bien la forma intracelular de Notch (NotchINTRA) (Brumby y Richardson, 2003; Pagliarini y Xu, 2003). Este tipo de clones *scrib*^{-/-} son capaces ahora de sobrecrecer hasta invadir todo el disco e incluso producir metástasis a otros tejidos (Pagliarini y Xu 2003). Este último extremo también ha sido comprobado para la combinación de *Ras*^{V12} con clones mutantes para *lgl* (Pagliarini y Xu, 2003), por lo que *scrib*^{-/-} *Ras*^{V12} y *lgl*^{-/-} *Ras*^{V12} son los modelos más ampliamente utilizados para estudiar el comportamiento de tumores neoplásicos en *Drosophila*.

Todos estos experimentos previos se realizaron siguiendo la misma metodología. Los clones tumorales se generaban mediante el sistema MARCM, teniendo la flipasa bajo el control del gen *eyeless* (*ey-Flp*). Dado que *ey* se expresa en el disco ojo, al cabo de cierto tiempo la mitad de las células del disco tienen el genotipo tumoral y la otra mitad permanecen silvestres (Brumby y Richardson, 2003; Pagliarini y Xu, 2003). Este tipo de aproximación permite la obtención de una gran cantidad de tejido tumoral. El hecho de que los clones sean generados en un único disco facilita la observación de fenómenos como la metástasis, sin embargo, deja de lado otros importantes aspectos de la progresión tumoral como es el comportamiento de los tumores en estadios muy tempranos cuando unas pocas células tumorales están rodeadas por

células silvestres. Es en esta capacidad de clones individuales *Igf^{-/-} Ras^{V12}* para formar tumores en la que nosotros hemos centrado nuestro estudio.

Realizamos experimentos de inducción de clones utilizando también el sistema MAR-CM pero con la flipasa bajo el control un promotor que responde a choque térmico “heat shock flipase” (hs-Flp). De esta forma tenemos una manera eficiente de controlar la cantidad de clones que generamos por disco. En nuestro caso nos centramos en el estudio de los clones en el disco de ala. Utilizamos dos aproximaciones: una en la que la densidad de clones por disco es alta (choque térmico 15 minutos) y otra en la que la densidad de clones por disco es baja (7 minutos de choque térmico), lo que permite un estudio más minucioso del comportamiento de clones individuales. Los discos se fijaban siempre 72 o 96 horas AHS. Para facilitar el análisis cuantitativo consideramos que se ha formado un tumor cuando el tejido mutante ocupa más del 50% del disco y además se observan sobrecrecimientos en el disco así como aberraciones morfológicas.

Las células *Igf^{-/-} Ras^{V12}* proliferan más rápido que las células silvestres.

Los clones *Igf^{-/-} Ras^{V12}* tienen una tasa de proliferación mucho mayor que las células silvestres que las rodean como queda claro al observar la incorporación de BrdU, así como por las tinciones de anticuerpos que detectan PH3 (no mostrado) o dMyc (Fig 21).

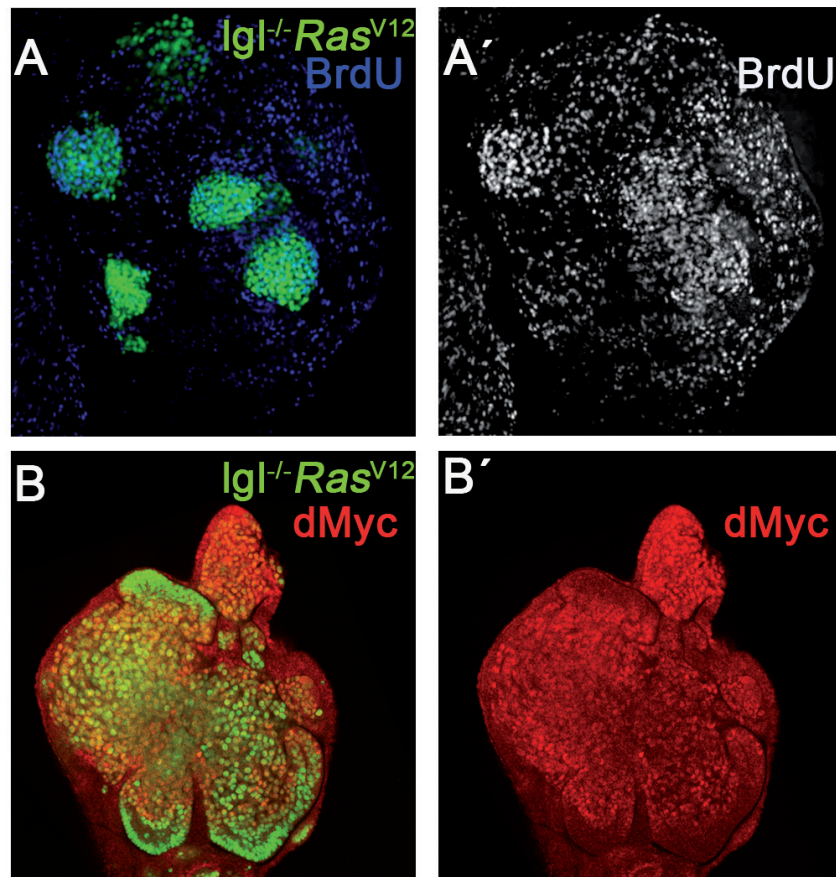


Figura 21. Proliferación en clones *Igf^{-/-} UASRas^{V12}*.

A-A') Los tumores *Igf^{-/-} UASRas^{V12}* tienen una mayor tasa de proliferación como muestran las tinciones con BrdU. B-B') Los tumores *Igf^{-/-} UASRas^{V12}* también muestran altos niveles del factor de transcripción y promotor del crecimiento dMyc.

Esto contrasta con lo que ocurre en los clones control en los que solamente sobreexpresamos *Ras^{V12}*, donde vemos un incremento de la cantidad de dMyc, como se había demostrado anteriormente (Prober and Edgar, 2000, 2002), pero la incorporación de BrdU se mantiene en niveles parecidos a los de las células silvestres. (Fig 22).

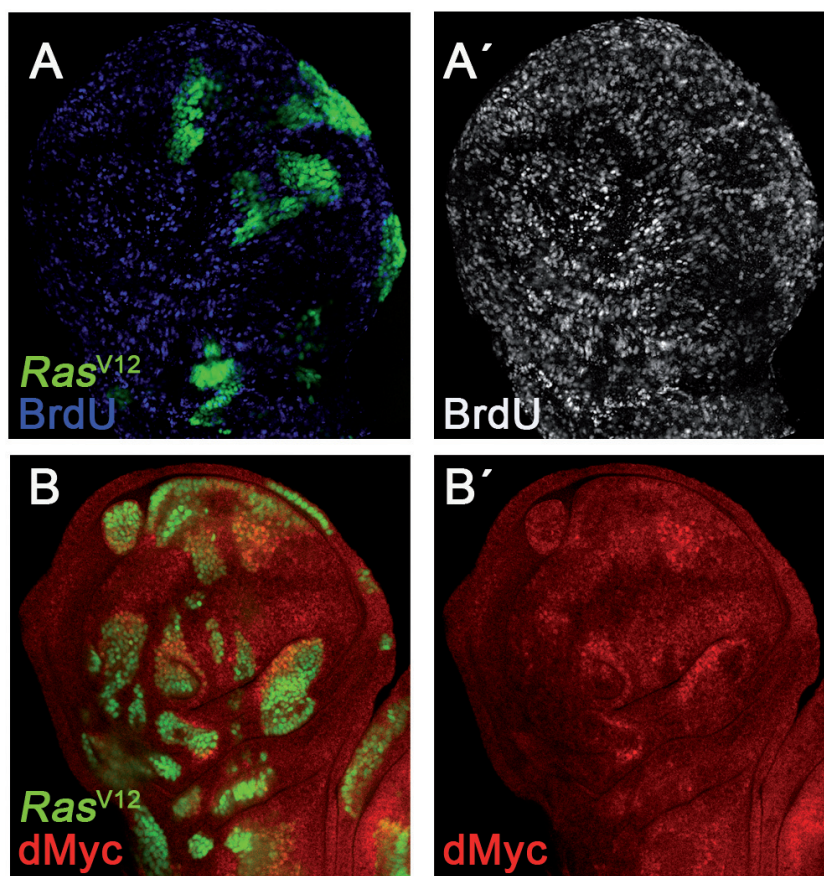


Figura 22. Proliferación en clones UASRas^{V12}.

A-A') Los clones control *lgl*⁺ que sobreexpresan Ras^{V12} se dividen al mismo ritmo que las células silvestres que los rodean como se observa en las tinciones con BrdU. B-B') Los niveles de dMyc sin embargo son más altos en los clones Ras^{V12} que en las células silvestres.

Tras 15 minutos de choque térmico los clones *lgl*^{-/-} Ras^{V12} suelen ocupar todo el disco formando tumores neoplásicos en un porcentaje cercano al 100% tras 96 o incluso 120 horas AHS. El disco adquiere una morfología aberrante y la larva no llega a estadio adulto.

Clones *lgl*^{-/-} Ras^{V12} son eliminados en un contexto *lgl*⁺.

Las tinciones con caspasa sugieren que cuando los tumores casi han colonizado todo el disco muchas células silvestres están muriendo por apoptosis. Sin embargo, un estudio más preciso de las imágenes muestra que, sorprendentemente, algunas células *lgl*^{-/-} Ras^{V12} situadas en el borde del clon, también tienen activada la ruta apoptótica (Fig. 23 y 24). Este efecto se observa con más claridad en aquellos clones tumorales pequeños que están completamente rodeados

por células silvestres. Eso nos llevó a la idea de que muchos de los clones *Igf^{-/-} Ras^{V12}* estaban siendo eliminados por apoptosis y por lo tanto no producían tumores. Para estudiar esta posible apoptosis realizamos el mismo experimento dando un choque térmico de 7 minutos, lo cual asegura la presencia de pocos clones en el disco. En este caso, mirando a 72 horas AHS, numerosos clones presentaban tinción con anti-caspasa 3 activa. Si seguimos la evolución de estos discos con poca densidad de clones vemos que a las 96 horas tras el choque térmico los clones no han sido capaces de invadir el disco y de hecho siguen mostrando caspasa en los bordes. Tras generar clones con 7 minutos de choque térmico, el porcentaje de discos invadidos por tumores era muy bajo (8%) (n = 100) (Fig 23A-B').

7 minutos de choque térmico

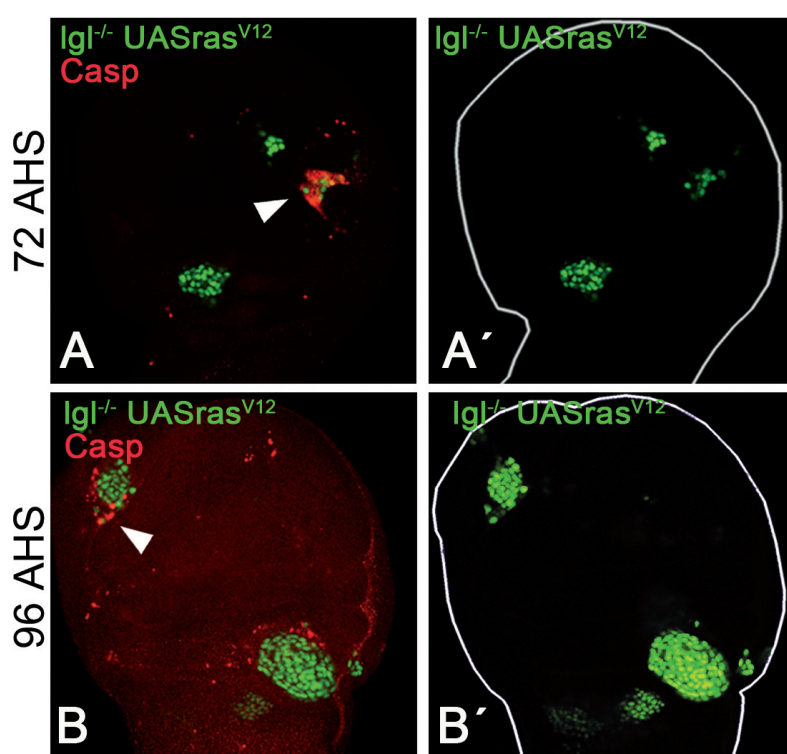


Figura 23. Apoptosis en clones *Igf^{-/-} UASRas^{V12}* inducidos en un contexto de baja densidad de clones.

A') A 72 horas AHS algunos clones tumorales muestran apoptosis, lo que lleva a la desaparición algunos clones pequeños. B-B') A las 96 horas AHS los clones que quedan no son capaces de invadir el disco de ala y algunos de ellos muestran caspasa, generalmente en el borde del clon.

En los discos en los que se dieron 15 minutos de choque térmico se observaba un mayor número de clones, pero a las 72 horas muchos de estos clones desaparecían, como demuestran las tinciones con apoptosis (Fig. 24A-A'). Más sorprendente es que a las 96 horas AHS, en

estos mismos discos que ya presentan tumores que casi han invadido todo el disco, se siguen observando células tumorales marcadas con anti-caspasa 3, generalmente células *Igl^{-/-} Ras^{V12}* en contacto con células silvestres (Fig. 24B-B'). En este caso también se observa apoptosis asociada al clon tumoral pero que parece pertenecer a células silvestres en contacto con el clon (Fig. 24B', observar flecha amarilla).

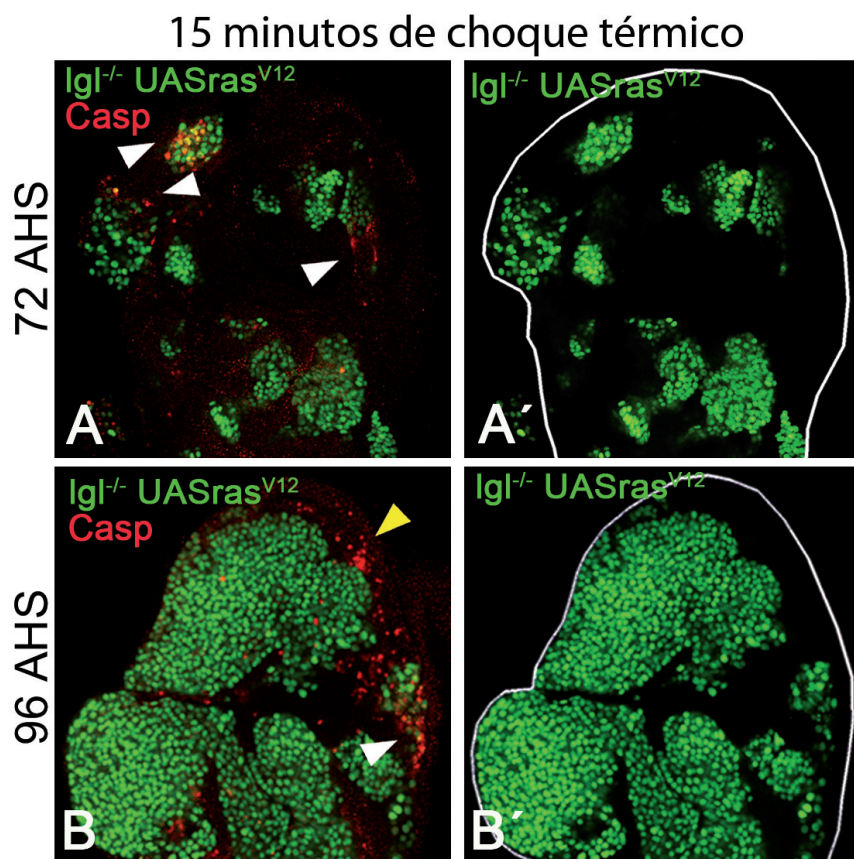


Figura 24. Apoptosis en clones *Igl^{-/-} UASRas^{V12}* inducidos en un contexto de alta densidad de clones.

A') A 72 horas AHS, al igual que tras 7 minutos de choque térmico, algunos clones muestran tinción con anti-Caspasa 3 activa. B-B') A las 96 horas AHS los clones tumorales han invadido casi todo el disco, sin embargo algunos pequeños clones aislados siguen mostrando apoptosis (flecha blanca). También se observa tinción con anti Caspasa en las células silvestres que rodean al clon (flecha amarilla).

Para analizar el efecto de la apoptosis en la formación de tumores, este experimento se llevó a cabo tanto de fondo *dronc⁺* como en fondo *dronc⁻*. En esta última situación la apoptosis se encuentra muy reducida con lo cual nos asegurábamos que la gran mayoría de los clones *Igl^{-/-} Ras^{V12}* no iban a desaparecer. Contamos el número de clones por disco y a 72 horas AHS el resultado era de 1,9 clones en fondo *dronc⁺* (n = 25), mientras que en fondo *dronc⁻* el número

de clones se eleva hasta 4,3 ($n = 24$). Esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0005$), indica que más de la mitad de los clones *Igf^{-/-} Ras^{V12}* están desapareciendo por apoptosis. También estudiamos si esta apoptosis se daba en células *scrib^{-/-} Ras^{V12}* ya que ninguno de los trabajos anteriores hacía mención a esta apoptosis. Efectivamente, utilizando la hs-Flp en este caso también se observa apoptosis en clones pequeños. En los clones que son más grandes se observa apoptosis en las células tumorales de los bordes, aquellas que están en contacto con las células silvestres (Fig 25A-A'').

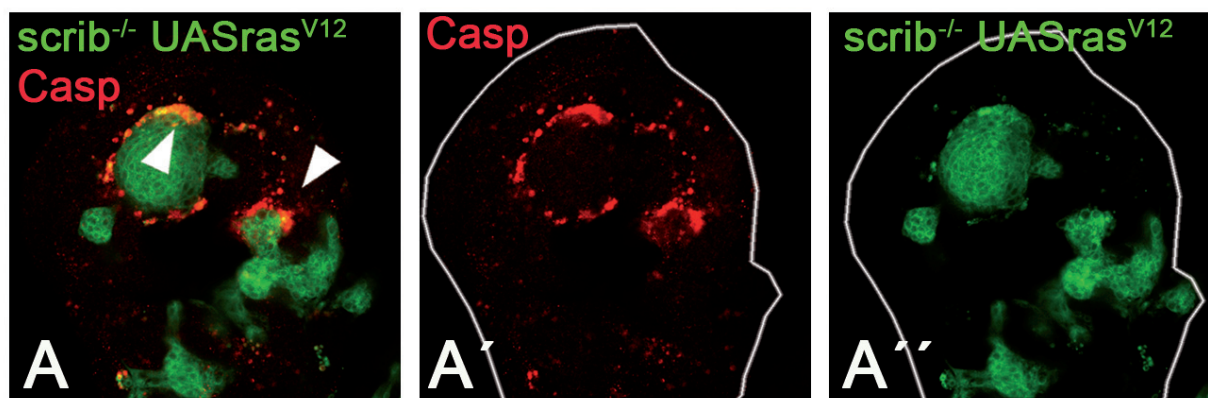


Figura 25. Apoptosis en clones *scrib^{-/-} UASRas^{V12}*.

A-A'') Los clones *scrib^{-/-} UASRas^{V12}*, que también son capaces de formar tumores invasivos, muestran apoptosis en las células tumorales del borde, precisamente aquellas células que están en contacto con las células silvestres. Imagen tomada por Ainhoa Pérez Garijo.

Los resultados anteriores pueden sugerir que las células *Igf^{-/-} Ras^{V12}* están siendo eliminadas por competición celular, ya que estas células per se son viables y sólo en contacto con células silvestres son eliminadas. Este resultado es completamente inesperado y sorprendente (véase discusión) ya que como hemos demostrado, las células *Igf^{-/-} Ras^{V12}* proliferan más rápidamente que las células silvestres que las rodean.

Puesto que la apoptosis afecta de manera clara a la supervivencia de las células tumorales, quisimos ver si este efecto también altera la capacidad para formar tumores. Comparando la frecuencia de tumores en fondo *dronc⁺* y *dronc⁻* 96 horas tras un choque térmico de 7 minutos, los resultados muestran que la proporción de tumores es de 8% en fondo *dronc⁺*, mientras que en fondo *dronc⁻* es 33%. Es decir, que si se protege a los clones tumorales evitando su eliminación la posibilidad de que se forme un tumor se cuadruplica. Esto apoya de manera clara la idea de que la apoptosis de estas células tumorales juega un importante papel como supresor de tumores y garantiza la eliminación de células que presenten lesiones potencialmente peligrosas para el tejido. Este resultado hizo que analizáramos más en detalle la capacidad de las células *Igf^{-/-} Ras^{V12}* para formar tumores.

Los clones *lgl^{-/-} Ras^{V12}* son capaces de unirse y formar un microambiente que los protege de la muerte.

Comparamos la formación de tumores en discos con alta y baja proporción de clones por disco. Realizamos el análisis siempre 96 horas AHS. En discos sometidos a un choque térmico de 15 minutos la proporción de tumores llegaba al 90% ($n = 91$) mientras que en el caso de discos a los que se les dio un choque térmico de 7 minutos esa proporción baja hasta el 8% ($n = 100$). De estos experimentos podemos sacar la conclusión de que no todos los clones *lgl^{-/-} Ras^{V12}* son capaces de llegar a formar tumores. Dicho de otra forma, la presencia de un clon tumoral en el disco no implica que este vaya a ser capaz de invadir el disco, de hecho probablemente sea eliminado por las células silvestres. La capacidad de formar tumores depende de la cantidad de células tumorales que haya en el disco. Esta afirmación es también apoyada por los experimentos de inducción de clones durante 7 minutos en fondo *dronc⁺* y *dronc⁻*, en los cuales una mayor cantidad de clones *lgl^{-/-} Ras^{V12}* propiciaba una mayor cantidad de tumores.

La gran diferencia existente en la cantidad de tumores que se forman en discos con alta y baja densidad de clones pudiera indicar que cuando el número de clones es elevado, éstos serían capaces de asociarse formando territorios tumorales más grandes que de algún modo facilitarían la progresión tumoral. Esta idea se refuerza cuando observamos discos 72 horas después de un choque térmico de 15 minutos. En ellos se observan muchos clones pequeños que están proliferando rápidamente, muy cerca unos de otros y que probablemente se unirán formando un gran territorio que dé lugar a un tumor (Fig. 26A-A'). Algunos de los clones probablemente desaparecerán porque muestran tinción con caspasa. Estos clones todavía no son capaces de colonizar todo el disco. A las 96 horas AHS se observa un estado más avanzado del tumor en el que una gran masa de tejido tumoral ocupa todo el disco (Fig. 26B-B'). A pesar de esto, como ya hemos dicho, aparece caspasa en las células tumorales del borde del clon.

Otro argumento para afirmar que se produce una fusión de clones nos la ofrece la cuantificación de los grupos de células tumorales que se aprecia a lo largo del desarrollo. Cuando analizamos la cantidad de estos grupos, observamos que a las 72 horas tenemos 12,3 por disco y que a las 96 horas esta cantidad desciende hasta 5,1. Pensamos que muchos de estos grupos de células tumorales proceden de clones individuales que se han fusionado para formar una gran masa tumoral. Se podría atribuir el descenso en el número de grupos de células en fondo *dronc⁺*, a que estaban siendo eliminados y no a que se estaban uniendo. Para eliminar esta posibilidad también contamos el número de grupos de clones en fondo *dronc⁻*, donde no existe la posibilidad de que estas células entren en apoptosis. En este experimento, a

las 72 horas AHS obtenemos 9,6 grupos de células por disco pasando a las 96 horas AHS a 2,3. La diferencia que obtenemos en el número de grupos de clones a las 72 horas (12,3 en fondo silvestre y 9,6 en fondo *dronc*) la achacamos a que al no estar siendo eliminados los clones *Igf^{-/-}Ras^{V12}*, se está produciendo una mayor fusión de clones.

Otro experimento que realizamos para marcar el origen de las células mutantes y así poder visualizar si se ha producido una fusión de células de distinto origen, fue teñir el disco con anti-*Engrailed* marcando así las células que hayan sido originadas en compartimento posterior. Como ya habíamos observado en el caso de los compartimentos mutantes para *Igf*, los clones *Igf^{-/-}Ras^{V12}* también mantienen la identidad antero-posterior. De 29 discos analizados 26 mostraban tumores en los que había mezcladas células de origen anterior y posterior (Fig. 26).

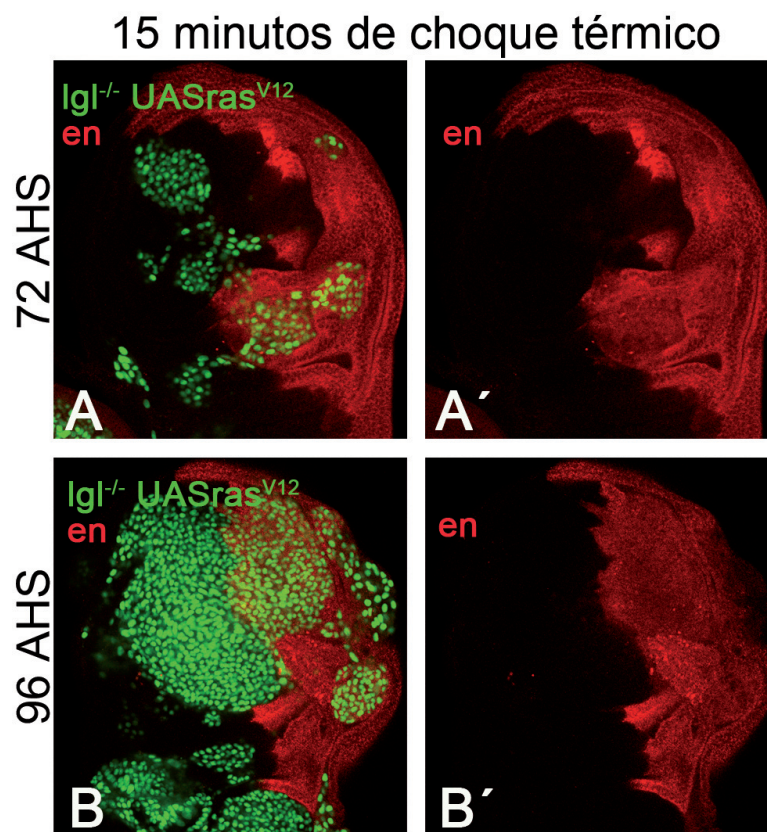


Figura 26. Fusión de clones *Igf^{-/-}Ras^{V12}* en discos con alta densidad de clones.

A-A') A 72 horas AHS se observan numerosos clones, algunos con origen A y otros con origen P, que se encuentran próximos entre sí. B-B') A las 96 horas AHS se observa una gran masa tumoral formada por varios clones y en la que se observan mezcladas células de origen A y P.

Los otros 3 casos mostraban células únicamente de origen anterior. También se analizaron discos tumorales de experimento de 7 minutos de choque térmico y en este caso también se observó que todos los tumores que eran capaces de colonizar el disco estaban compuestos por células de origen tanto anterior como posterior (Fig 27A-B').

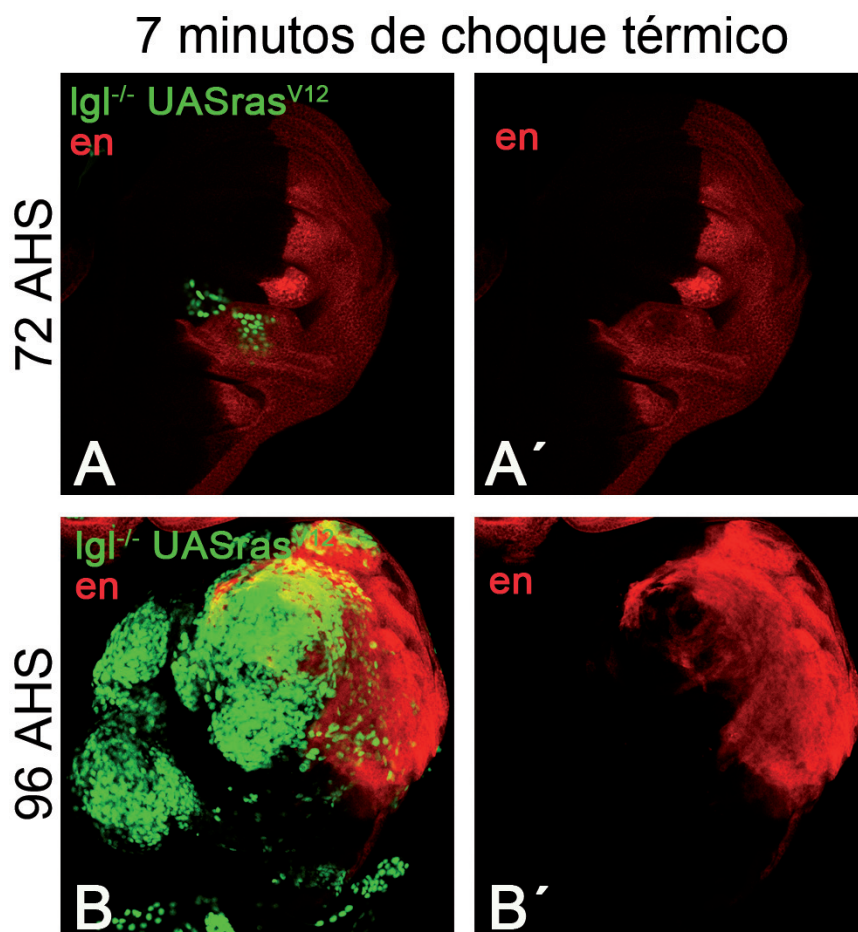


Figura 27. Fusión de clones *Igl^{-/-} Ras^{V12}* en discos con baja densidad de clones

A-A') A 72 horas AHS se observan dos clones muy cercanos, uno de origen A y otro de origen P. B-B') A las 96 horas AHS, en uno de los pocos casos en los que se forman tumores que invaden todo el disco, las masas tumorales también están formadas por células A y P.

Como en el experimento de 7 minutos de choque térmico, medimos la proporción de tumores obtenidos dando 15 minutos de choque térmico en fondo *dronc⁺* y *dronc⁻*, y en este caso no se aprecian diferencias notables (91 y 100% respectivamente). Esto contrasta con los resultados obtenidos en el experimento de 7 minutos de choque térmico, en el que la supervivencia de los clones en fondo *dronc⁻* se traducía en un importante aumento en la proporción

de tumores. Esto podría indicar que cuando el número de clones es elevado, el efecto protector que tiene sobre los clones la eliminación de la apoptosis queda atenuado. En este caso, el papel protector lo está jugando en nuestra opinión la fusión de distintos clones, proceso mediante el cual podría verse reducida la competición celular a la que están sometidos los clones tumorales.

Los clones *lgl*^{-/-} Ras^{V12} tienen la vía de Hippo inhibida.

Puesto que las células *lgl*^{-/-} Ras^{V12} muestran un nivel de proliferación más alto que las silvestres que las rodean, decidimos estudiar las causas de esta diferencia. Una de las posibilidades que estudiamos fue la implicación de la ruta de Hippo en este proceso. La ruta de Hippo es un regulador negativo del crecimiento (Huang y cols., 2005). La función normal de la vía resulta en la fosforilación del factor de transcripción *Yorkie* (Yki) lo que le impide translocarse al núcleo imposibilitando que active la transcripción de diversos genes como son el micro RNA bantam (un promotor del crecimiento), ciclina E (regulador del paso G1-S en el ciclo celular) o diap1 (gen anti-apoptótico). De esta forma la activación de la vía Hippo lleva consigo la inactivación de Yki y por tanto provoca inhibición del crecimiento. De manera recíproca la inactivación de la ruta de Hippo promueve la translocación de Yki al núcleo y por tanto se aumenta la proliferación celular.

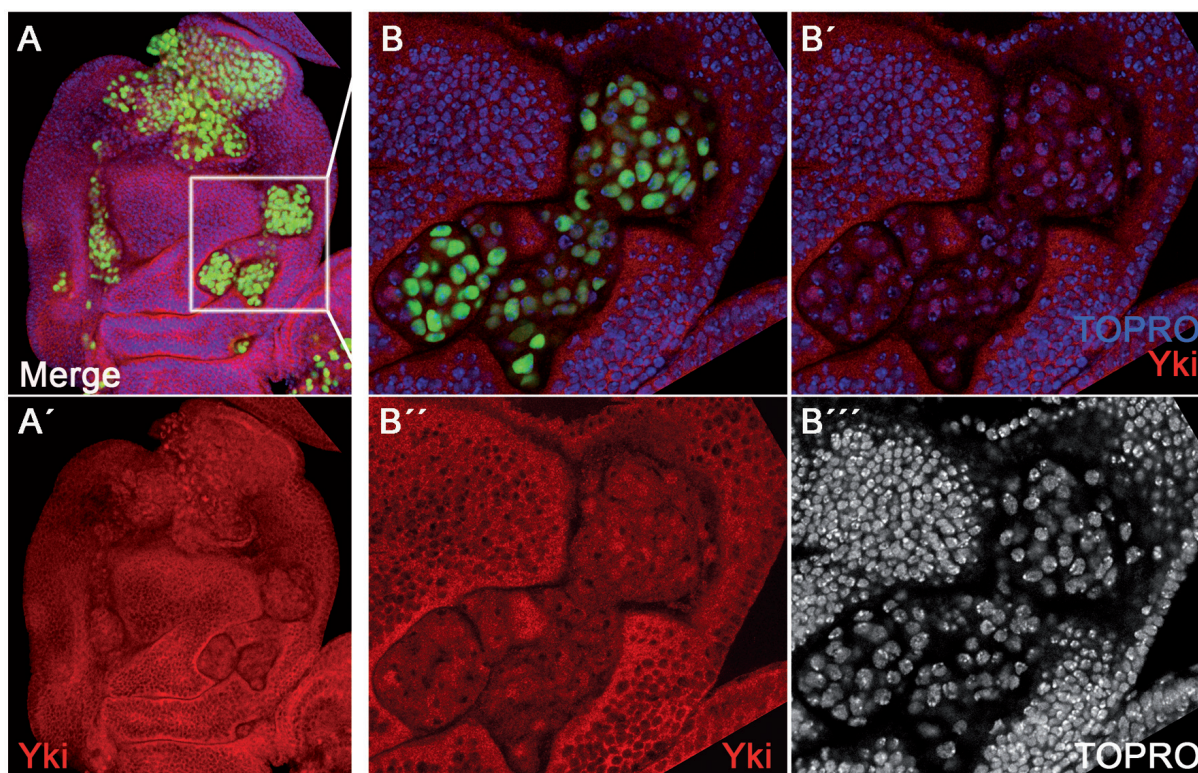


Figura 28. Inactivación de la vía de Hippo en clones *lgl^{-/-} UASRas^{V12}*.

A-A') La inactivación de la vía de Hpo queda patente por la translocación de Yki al núcleo. En esta imagen se observa que todos los clones *lgl^{-/-} UASRas^{V12}* translocan Yki al núcleo. B-B''') Amplificación de la figura A. El clon tumoral presenta translocación de Yki al núcleo como se aprecia en la figura B', donde colocaliza Yki con el marcador nuclear TOPRO. Este hecho contrasta con la localización citoplásmica de Yki en las células silvestres que rodean al clon. Cabe señalar que en la tinción de Yki nuclear en el clon *lgl^{-/-} UASRas^{V12}* se observa pequeños puntos faltos de tinción sin embargo estos puntos corresponden con zonas de alta tinción con TOPRO (B') que señala nucleólos.

Para detectar el nivel de activación de la vía usamos el anticuerpo que detecta específicamente a Yki. Con este anticuerpo se distingue cuando Yki se encuentra localizado en el citoplasma (vía de Hippo activada) o en el núcleo promoviendo proliferación (vía de Hippo inhibida). Las tinciones con el anticuerpo anti-Yki muestran que todos los clones *lgl^{-/-} Ras^{V12}* tienen Yki translocado al núcleo, lo que indica que se está promoviendo la proliferación celular (Fig. 28A-B'). Esta translocación de Yki se observa incluso en aquellos clones pequeños que no son capaces de invadir el disco (Fig 29A-B'). Hemos comprobado también la localización de Yki en clones *scrib^{-/-} Ras^{V12}*, encontrando también la ruta de Hippo inhibida, es decir, Yki nuclear (Fig. 30).

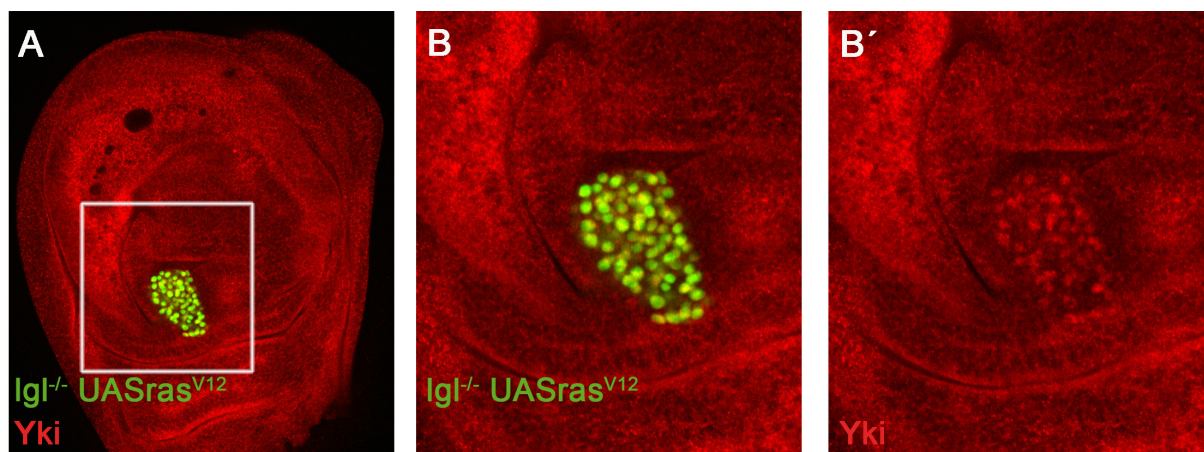


Figura 29. Inactivación de Hpo en pequeños clones *Igl*^{-/-} UASRas^{V12}.

A) Incluso en pequeños clones aislados que no han sido capaces de invadir todo el disco también se observa translocación de Yki al núcleo. B-B') Ampliación de la imagen que se muestra en A. La tinción con GFP es nuclear y se observa una clara colocalización con la tinción de Yki.

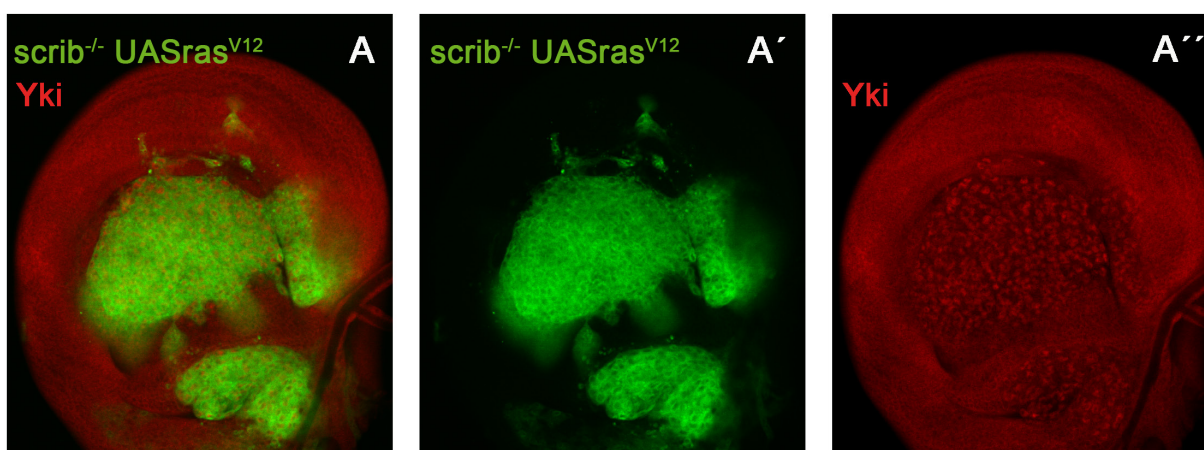


Figura 30. Inactivación de Hpo en clones *scrib*^{-/-} UASRas^{V12}.

A-A'') Los clones *scrib*^{-/-} UASRas^{V12} también muestran translocalización de Yki al núcleo. En este caso La tinción con GFP es citoplasmática. Imagen tomada por Ainhoa Pérez Garijo.

También utilizamos como indicador de actividad en la vía Hippo un reportero del gen *diap1*, gen diana de la vía Hippo, que tiene insertado el gen *lacz* en el locus *diap1*. Cuando la vía de Hippo se encuentra inhibida (es decir cuando Yki está localizado en el núcleo) se activa la transcripción de *dIAP1*. Las tinciones con β -Gal utilizando el *diap-lacz* muestran activación de la transcripción de *lac-z* en los clones *Igl*^{-/-} Ras^{V12}, lo que refuerza la idea de que la vía de Hippo está inhibida en estos clones (Fig. 31).

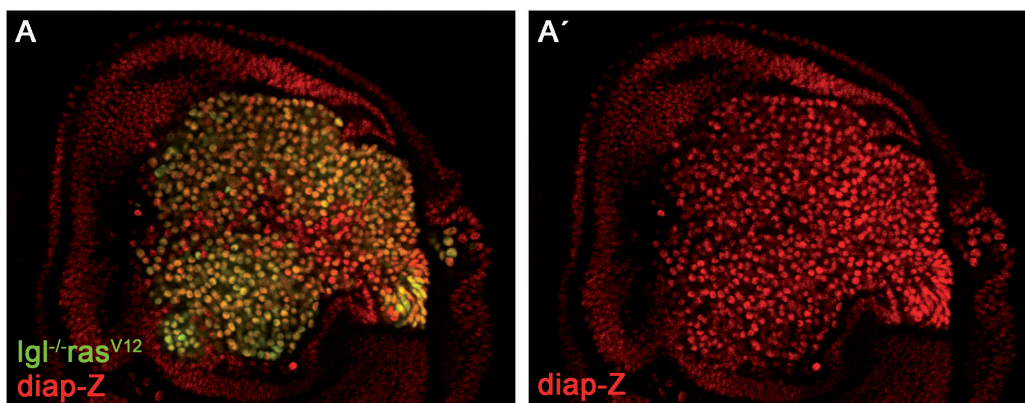


Figura 31. Transcripción del gen *diap1-lacZ* en clones *lgl*^{-/-} UAS*Ras*^{V12}.

A-A'') En todas las células del clon se aprecia un aumento en los niveles de lacZ, lo que sugiere un aumento en la transcripción de *diap1* de la transcripción del lac-z. Imagen tomada por Ainhoa Pérez Garijo.

Como control, comprobamos la inhibición de la vía Hippo tanto en clones mutantes para *lgl*, como en clones *lgl*^{-/-} que sobreexpresan *Ras*^{V12}. En ninguno de los dos casos observamos tinción de Yki translocado al núcleo (Fig. 32A-B'). Otros autores muestran sin embargo translocación de Yki al núcleo en los clones *lgl*^{-/-} (Grzeschik y cols., 2010). El hecho de que los clones *lgl*^{-/-} sean eliminados por apoptosis podría dificultar la tinción con anti-Yki, por lo que comprobamos el nivel de activación de la vía Hippo en clones *lgl*^{-/-} que sobreexpresan *puc*, lo que como hemos visto impide la apoptosis de estos clones. En este caso tampoco hemos observado translocación de Yki al núcleo. (Fig 33A-A'). Ya que ni los clones *lgl*^{-/-} ni la sobreexpresión de UAS*Ras*^{V12} son capaces de translocar Yki al núcleo por si solos, la inactivación de la vía de Hippo que se observa en los tumores *lgl*^{-/-} UAS*Ras*^{V12} es atribuible solamente a un efecto combinado de las dos. Las razones por la que esta combinación de ganancia de función de un oncogén y pérdida de función de un gen supresor de tumores produce translocación de Yki al núcleo permanecen sin resolver.

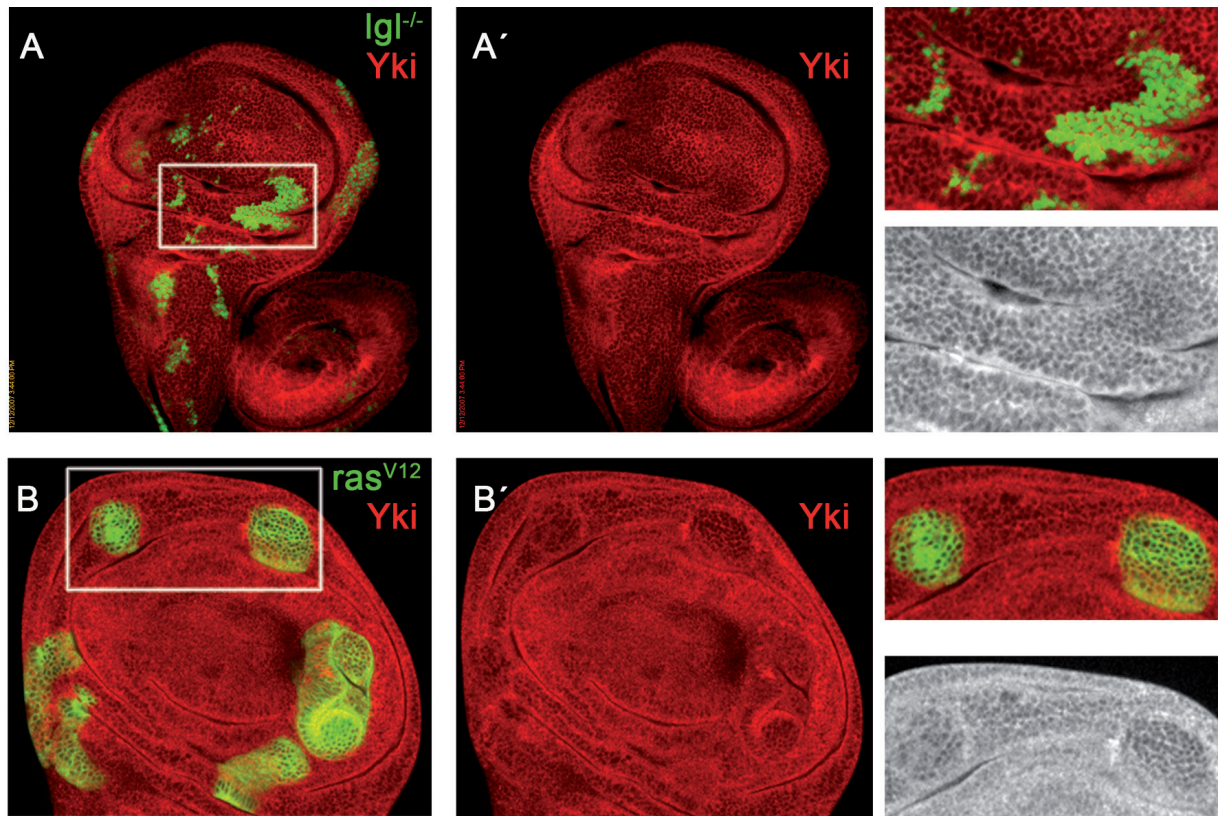


Figura 32. Vía de Hippo en clones control *Igl*^{-/-} y clones UASRas^{V12}.

A-A') En los clones *Igl*^{-/-} no se observa translocación de Yki al núcleo, como se aprecia en la ampliación, lo que indica activación de la vía de Hippo B-B') Los clones UAS-Ras^{V12}, silvestres para *Igl*, tampoco son capaces de translocar Yki al núcleo.

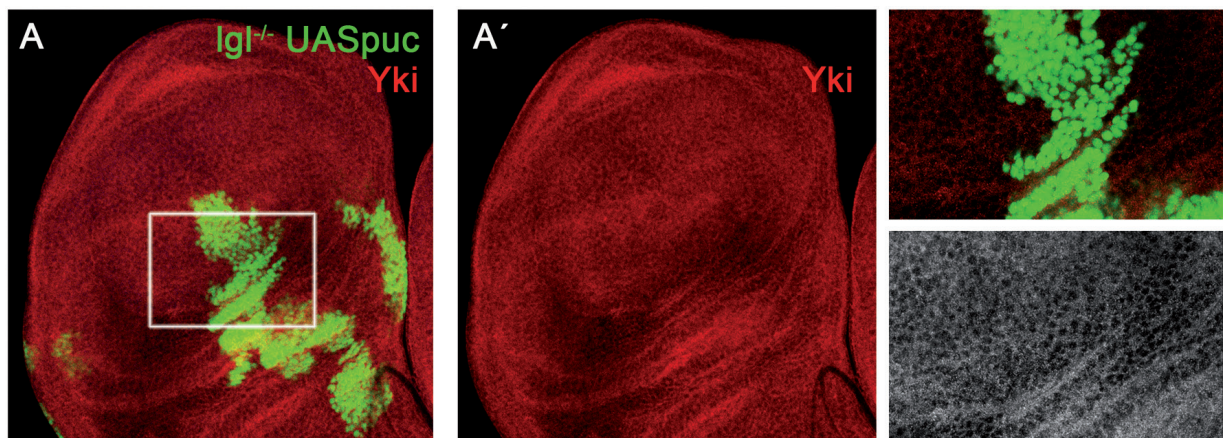


Figura 33. Estado de activación de la vía de Hippo en clones *Igl*^{-/-} rescatados de la muerte sobreexpresando *puc*.

A-A') Los clones *Igl*^{-/-} UAS*puc* tampoco son capaces de translocar Yki al núcleo, a pesar de que estos clones no son eliminados por apoptosis.

Clones *Igf^{-/-}* UAS Yki son capaces de formar tumores e invadir todo el disco.

El hecho de que los clones *Igf^{-/-}* Ras^{V12} mostraran translocación de Yki al núcleo y activación de diap1 situaba la ruta de Hippo como un posible factor crítico en la capacidad de los clones *Igf^{-/-}* Ras^{V12} para producir tumores. Para comprobar si la inhibición de la vía Hippo era suficiente para formar tumores sobreexpresamos Yki en células mutantes para *Igf*. Como control utilizamos células que sobreexpresan Yki y que son *Igf^{+/+}*. Se ha visto que la sobreexpresión de Yki en clones hace que estos proliferen más rápidamente que las células silvestres que les rodean dando origen a sobrecrecimientos hiperplásicos. (Huang y cols., 2005) Es importante resaltar que estas células *Igf^{+/+}* sobreexpresando Yki no muestran apoptosis (Fig. 34).

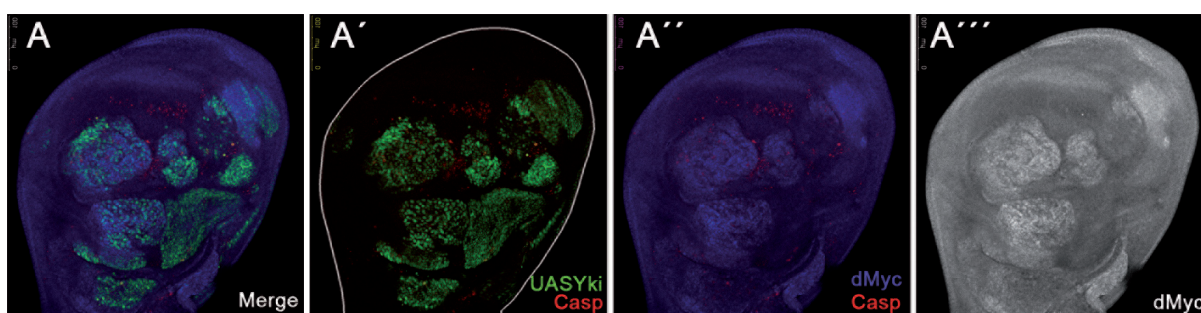


Figura 34. Clones control *Igf^{+/+}* UASYki.

Los clones que sobreexpresan Yki provocan sobrecrecimientos y aparición de caspasa en las células silvestres que rodean al clon pero no se observa caspasa dentro del clon.

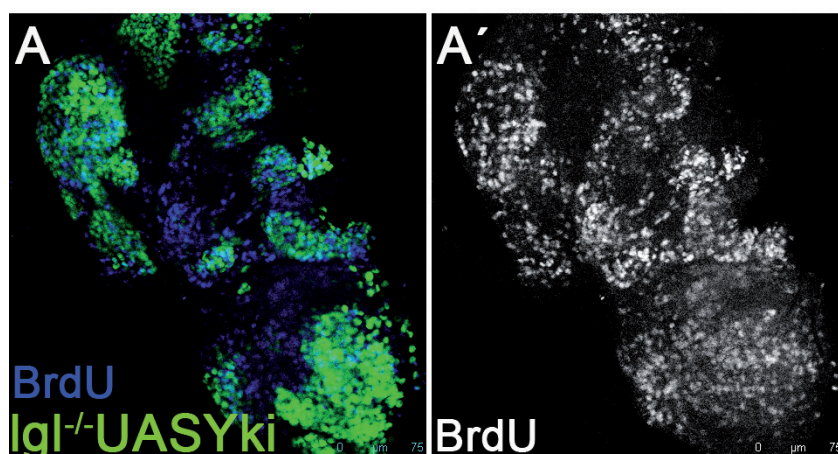


Figura 35. Clones tumorales *Igf^{-/-}* UASYki.

A-A') Al igual que los clones *Igf^{-/-}* UASRas^{V12} la sobreexpresión de Yki en clones *Igf^{-/-}* también provoca una mayor proliferación de los clones tumorales que de las células silvestres que rodean al clon.

Cuando se sobreexpresa Yki en clones *lgl*^{-/-} se observa sin embargo un aspecto muy parecido al de la sobreexpresión de Ras^{V12}. Los clones *lgl*^{-/-} UAS Yki muestran más acumulación de BrdU (Fig 35A-A') que las células silvestres que los rodean. También muestran mayores niveles de dMyc y, como en el caso de los clones *lgl*^{-/-} Ras^{V12}, son capaces de colonizar todo el disco. Podemos concluir por tanto que la inhibición de la vía de Hippo es suficiente para lograr que las células mutantes para *lgl* formen tumores. Esto también sugiere que la inhibición de la vía de Hippo es posiblemente el mecanismo por el cual los clones *lgl*^{-/-} Ras^{V12} son capaces de producir tumores neoplásicos.

Intentamos comprobar si mediante la activación de la vía Hippo era posible rescatar el fenotipo tumoral de los clones *lgl*^{-/-} Ras^{V12}. Para ello utilizamos la sobreexpresión de Hippo. Sin embargo, la sobreexpresión de la vía Hippo impide la división celular y por lo tanto el crecimiento de los clones, tanto de los mutantes *lgl* como de los no mutantes, por lo que estos resultados no son significativos. De momento no hemos encontrado el modo idóneo de activar la vía Hippo en los niveles adecuados para permitir la proliferación normal de las células pero no los sobrecrecimientos.

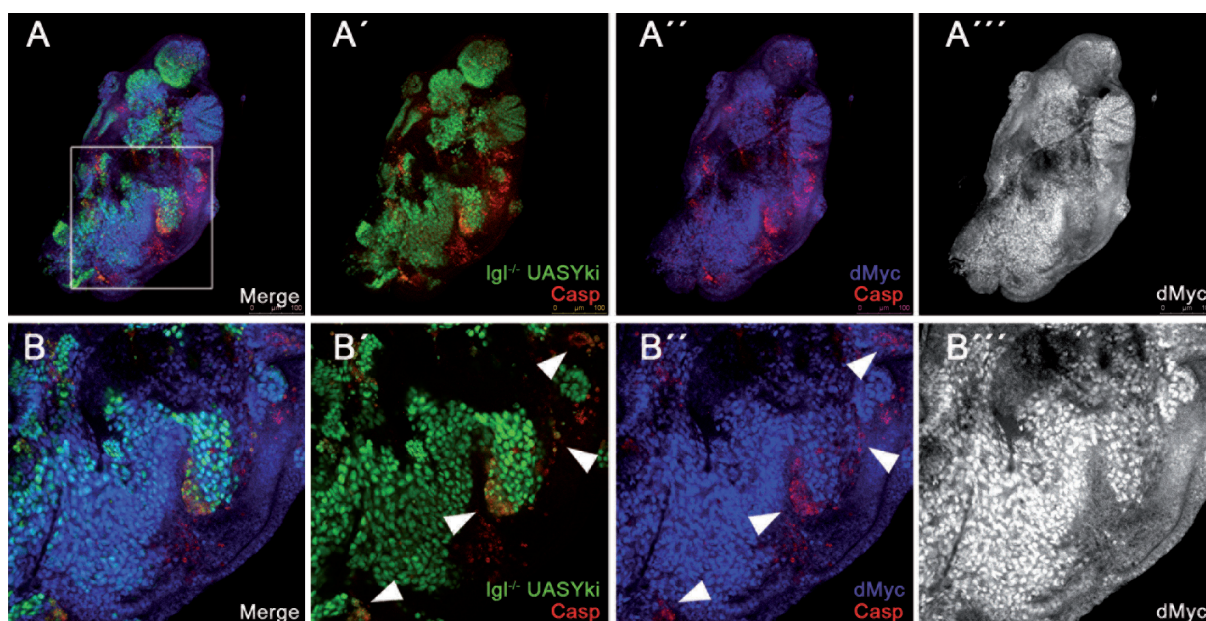


Figura 36. Clones *lgl*^{-/-} UASYki también son eliminados.

A-A') Los clones *lgl*^{-/-} UASYki a pesar de proliferar más que las células silvestres también entran en apoptosis. Al igual que los clones *lgl*^{-/-} UASRas^{V12} esta apoptosis se produce específicamente en las células tumorales del borde del clon o bien en aquellos pequeños clones que se encuentran completamente rodeados por células silvestres. B-B') Ampliación de una sección del disco. Las flechas blancas indican células o clones *lgl*^{-/-} UASYki que están siendo eliminados por apoptosis.

Al igual que en los clones *lgl*^{-/-} Ras^{V12}, con la sobreexpresión de Yki también observamos que algunos clones pequeños están siendo eliminados y que en clones más grandes la apoptosis afecta a las células *lgl*^{-/-} UAS Yki del borde del clon (Fig. 34A-B'). Si analizamos más en detalle la tinción con dMyc podemos ver que justo las células *lgl*^{-/-} UAS Yki que han entrado en apoptosis tienen menores niveles de dMyc que las células vecinas. (Fig. 36 A''-A''', B''-B''').

V. DISCUSIÓN

El desarrollo anormal de larvas homocigóticas mutantes para *lgl* se conoce desde hace tiempo (Gateff, 1978). En estas larvas aparecen grandes tumores neoplásicos en el cerebro y en los discos imaginales. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que los clones de células mutantes para *lgl*, cuando están rodeados de células silvestres no sólo no son capaces de formar tumores, sino que son eliminadas (Agrawal y cols., 1995). Sólo cuando las células *lgl*^{-/-} poseen una ventaja proliferativa adicional, por ejemplo la que confiere la expresión constitutiva de la vía de Ras, son capaces de formar tumores neoplásicos invasivos (Pagliarini y Xu 2003). La misma observación fue realizada en el caso de clones mutantes para *scrib*. Esta tesis se ha basado en el estudio del comportamiento de clones mutantes para *lgl* en el disco de ala para tratar de averiguar la causa por la cual estos clones son eliminados y el mecanismo involucrado en la formación de tumores cuando se les da una ventaja proliferativa adicional. Algunas de las conclusiones más importantes que se desprenden de este trabajo son:

- A) *Las células lgl^{-/-} son eliminadas por competición celular pero no debido a una menor tasa de proliferación.*
- B) *La inhibición de la vía de Hippo es uno de los factores críticos a la hora de dar capacidad a las células lgl^{-/-} para formar tumores.*
- C) *Los clones lgl^{-/-} Ras^{V12} son capaces de fusionarse y formar un microambiente que los protege de la competición celular dando lugar a tumores.*
- D) *La competición celular como mecanismo supresor de tumores*

A. - Las células $lgl^{-/-}$ son eliminadas por competición celular pero no debido a una menor tasa de proliferación.

Definimos la competición celular como el proceso que tiene lugar cuando dos tipos de células viables interactúan y como resultado de esta interacción se produce la muerte de uno de estos tipos celulares. Las células $lgl^{-/-}$ son viables y esto queda demostrado por el hecho de que tanto las larvas como los compartimentos mutantes para lgl son capaces de formar sobrecrecimientos y sobrevivir durante 13 días, momento en el cual la larva muere (Gateff, 1978). Sin embargo, cuando estas mismas células entran en contacto con células silvestres, son eliminadas del tejido. Por tanto podemos concluir que las células lgl son eliminadas por competición celular. Los experimentos en clones también refuerzan la idea de la competición celular. Cuando se produce apoptosis en estos clones, entre las 48 y las 72 horas tras la formación de los mismos, la caspasa activada se restringe a los bordes de los clones, sugiriendo que ésta aparece como consecuencia de la interacción con células lgl^{+} . Otro argumento que refuerza esta idea la obtenemos de los datos que muestran activación de la ruta JNK. Diversos trabajos realizados sobre competición celular tanto con mutantes *Minute* (Moreno y cols., 2000) como modificando los niveles de dMyc (de la Cova y cols., 2004; Moreno y Basler 2004) muestran que una característica de la competición celular es la activación de la ruta JNK. En los clones mutantes para lgl también observamos una activación de la ruta. Hay una excepción sin embargo en la cual las células mutantes lgl en contacto con células silvestres no son eliminadas y es cuando este contacto se produce entre diferentes compartimentos. Esto es interesante puesto que el fenómeno de competición celular tampoco se produce entre distintos compartimentos. Los clones M^{+} que se desarrollan en fondo $M^{-/+}$ nunca cruzan el borde de compartimento ni se observa apoptosis a través de estos bordes (Simpson y Morata, 1981). Cuando hacemos el compartimento posterior mutante para lgl , permaneciendo el anterior silvestre, observamos que el borde A/P se mantiene y las células del compartimento posterior siguen expresando *engrailed*, lo cual quiere decir que estas células siguen manteniendo una identidad de posterior. En este caso no se observa apoptosis de las células $lgl^{-/-}$ en contacto con las células silvestres del compartimento anterior. También en los experimentos con dMyc se observa que la competición celular no se produce a través de los compartimentos anterior y posterior (de La Cova y cols., 2004). Es posible que esta diferencia de identidad de las células anteriores y posteriores sea la que impide que las células $lgl^{-/-}$ y las células silvestres establezcan una interacción o comunicación que es la que lleva a la identificación y eliminación de las células $lgl^{-/-}$.

La competición celular clásica ha sido definida como la que tiene lugar tras la interacción de células con diferente tasa de proliferación (Morata y Ripoll, 1974). La competición celular en este

caso garantizaría que se eliminan las células más débiles, favoreciendo la robustez del tejido. Sin embargo, los datos recopilados en esta tesis muestran que las células *lgl*^{-/-} no tienen una menor tasa de proliferación celular y por lo tanto nosotros proponemos que su eliminación por competición celular se debe a que son detectadas como diferentes por las células silvestres. A lo largo de esta tesis se han mostrado algunas evidencias que apoyan esta conclusión:

1. – El experimento de discos con compartimentos posteriores *lgl*^{-/-} da muestra de la normal tasa de proliferación de las células mutantes. En unos primeros momentos, el compartimento posterior aparece más pequeño de lo que debería (esto es debido probablemente a la aparición de caspasa activada (indicador de apoptosis) en los compartimentos posteriores *lgl*^{-/-}. Como ya hemos dicho, esta apoptosis no aparece asociada al borde y su cantidad y localización es muy variable entre distintos discos. Las larvas mutantes para *lgl* también exhiben esta apoptosis variable. Más indicativas que las mediciones del ratio P/A son las tinciones de marcadores de proliferación como BrdU o PH3. Tanto el compartimento anterior como el posterior muestran aproximadamente la misma cantidad de ambos marcadores, indicando una similar tasa de proliferación. Debido a que estas larvas no pupan podemos seguir su desarrollo durante largo tiempo. A 216 horas AEL, el compartimento posterior es mucho más grande que el anterior (P/A = 1,25). Marcadores de proliferación como BrdU o PH3 no muestran proliferación en el compartimento anterior. Sin embargo, el compartimento posterior sigue mostrando tinción de ambos marcadores. Nuestra interpretación de estos resultados es que las células *lgl* no tienen diferente tasa de división que las células silvestres, simplemente no dejan de crecer. Las células que componen un compartimento son capaces de reconocer cuando el compartimento ha alcanzado su tamaño final y dejan de proliferar (Martín y Morata, 2006). Las células *lgl*^{-/-}, en cambio, no son capaces de hacerlo. Esta, como explicamos anteriormente, es una de las características que cumplen las células tumorales: no son capaces de responder a los estímulos de parada de proliferación. Este hecho también se observa en las líneas celulares de mamífero, que son refractarias a la inhibición por contacto (Alberts y cols., 2002). De esta característica de las células *lgl*^{-/-} puede surgir su potencial tumorogénico.

2. - La comparación de tamaño entre clones *lgl*^{-/-} y clones silvestres respalda la idea de que las células *lgl*^{-/-} no proliferan más lentamente. Aquí observamos que durante las primeras 48 horas el clon *lgl*^{-/-} y el clon gemelo tienen el mismo tamaño, poniendo de manifiesto que proliferan de manera similar. Sin embargo a las 72 horas tras la formación del clon se ve una diferencia significativa en el tamaño de los clones. Esta observación fue realizada también por Foldi y cols, (2010) y en ese trabajo se atribuye esta diferencia a una menor tasa de proliferación del tejido mutante para *lgl*. En nuestra opinión, esta diferencia se debe a la apoptosis que se produce en esos clones, puesto que ese menor tamaño coincide en el tiempo con la aparición de señal de activación de caspasa. Alrededor de las 72 horas desde la formación del clon, las células *lgl*^{-/-} ya son detectadas como

diferentes por las células silvestres y empiezan a ser eliminadas, como demuestra la aparición de caspasa activada preferentemente en los bordes. Otra explicación plausible es que realmente las células *lgl*^{-/-} se dividan más lentamente pero que esta diferencia en la tasa de división se encuentre atenuada durante las primeras 48 horas de crecimiento del clon debido a la perdurancia de la proteína *Lgl*. En nuestra opinión, esta explicación resulta improbable debido a que en esas 48 horas en el disco imaginal de ala se producen aproximadamente 6 divisiones (Martín y cols., 2009) Esto supone que a las 48 horas las células del clon tendrán aproximadamente entre 1/16 y 1/32 de la cantidad de *Lgl* de la célula madre (si la proteína no está sometida a degradación). Esta cantidad de proteína parece insuficiente. Asimismo los clones *lgl*^{-/-} protegidos de la muerte con UASpuc no muestran una menor proliferación si observamos tinciones con BrdU, apoyando la idea de una proliferación similar de ambos tipos de células.

3. – El tercer y más importante argumento es que los clones *lgl*^{-/-} son eliminados aunque posean una ventaja proliferativa. Cuando hacemos los clones en un fondo *Minute*, a pesar de que en este caso las células *lgl*^{-/-} son *M*⁺ y cuentan con una ventaja proliferativa sobre las demás células, siguen siendo eliminadas. Este extremo ha sido demostrado en un trabajo reciente (Froldi y cols., 2010). En la misma dirección apuntan los experimentos en los que se sobreexpresa Ras^{V12} o Yki. En este caso la ventaja proliferativa es tal que en muchos casos estos clones son capaces de formar tumores. No obstante los clones pequeños siguen siendo eliminados y en los clones más grandes la apoptosis se observa en el borde. Rara vez la apoptosis se observa en el centro del clon.

*B. – La inhibición de la vía de Hippo es uno de los factores críticos a la hora de dar capacidad a las células *lgl*^{-/-} para formar tumores.*

Hemos utilizado dos modelos en los cuales los clones *lgl*^{-/-} adquieren un fenotipo tumoral. Uno ya había sido en parte descrito con anterioridad y es la expresión constitutiva de la vía de ras (Ras^{V12}) (Brumby y Richardson, 2003; Pagliarini y Xu, 2003). De manera adicional, en esta investigación hemos descubierto que la sobreexpresión de Yki (equivalente a la inhibición de la vía de Hippo) en células *lgl*^{-/-} produce un fenotipo similar al mostrado por *lgl*^{-/-} Ras^{V12}. En ambos casos las células tumorales forman unas masas redondeadas que proliferan más rápidamente que las células silvestres, según muestran las tinciones de BrdU y de PH3, y que muestran asimismo unos mayores niveles de dMyc. A pesar de esta mayor proliferación seguimos observando, como se ha mencionado anteriormente, que las células de los bordes de estos tumores siguen siendo eliminadas. Si la cantidad de clones es suficiente las células tumorales acaban por ocupar todo el disco. En ese avance del tumor, células silvestres que están en contacto con el clon tumoral empiezan a ser eliminadas.

En nuestros experimentos hemos demostrado que los clones *lgl*^{-/-} Ras^{V12} tienen inhibida la

vía de Hippo y también que los clones *lgl^{-/-}* UASYki en los que se fuerza la inhibición de la vía de Hippo, son capaces de formar tumores que acaban invadiendo el disco. Esto sugiere que la inhibición de esta vía es un factor crítico a la hora de conferir a las células *lgl* la capacidad de formar tumores y colonizar el disco. La sobreexpresión de Yki en células sin la polaridad alterada (*lgl^{+/+}*) en ocasiones produce muerte en las células silvestres, cosa que no ocurre dentro del clon que sobreexpresa Yki. Estas células, sin embargo, adquieren una mayor proliferación y en concreto mayores niveles de dMyc. Diferencias en los niveles de dMyc entre células adyacentes se ha probado que produce la eliminación de aquellas células que tiene menores niveles de dMyc (de la Cova y cols., 2004; Moreno y Basler 2004). Esta podría ser la causa de la apoptosis observada en las células que rodean los clones UASYki. En el caso de los clones *lgl^{-/-}* con la vía de Hippo inhibida (UASRas^{V12} o UASYki), actúan dos fuerzas opuestas. Por una lado las células silvestres reconocen a las células *lgl^{-/-}* como diferentes e inducen su eliminación, incluso aunque estas tengan una mayor tasa de división. Por otro lado las células *lgl^{-/-}* (UASRas^{V12} o UASYki), al tener una mayor tasa de división, inducen competición celular “clásica” en las células silvestres que las rodean. De tal manera que es posible tener apoptosis por competición celular tanto dentro como fuera del clon.

*C. – Los clones *lgl^{-/-}* Ras^{V12} son capaces de fusionarse y formar un microambiente que los protege de la competición dando lugar a tumores.*

Un resultado llamativo de nuestra investigación es que los clones *lgl^{-/-}* Ras^{V12} son más efectivos formando tumores si están presentes en el disco en gran número. Un choque térmico corto (de 7 minutos) daba lugar a un porcentaje de tumores del 8% (entendiendo como tumor aquella situación en la que más del 50% del disco está ocupado por células mutantes y se observan malformaciones en la morfología del disco). En este caso, además, la mitad de los clones eran eliminados. Sin embargo, en discos con alta densidad de clones (choque térmico de 15 minutos) el porcentaje de clones se multiplica por 5-6 y el porcentaje de tumores por 10. Esto sugiere que un único clon *lgl^{-/-}* Ras^{V12} es muy difícil que llegue a invadir el disco. De hecho este clon tumoral muy probablemente será eliminado como parte de un mecanismo de defensa del tejido contra células peligrosas. En nuestra opinión la causa por la cual los discos con alta concentración de clones forman un porcentaje tan alto de tumores es porque son capaces de formar un microambiente que les protege de la competición celular mediante un proceso de fusión de clones. Este proceso puede visualizarse empleando las tinciones con anti-en. Se observa que la gran mayoría (cerca del 90%) de los tumores están formados por células tanto de origen anterior como posterior (n = 29). También es indicativo el hecho de que en discos con alta densidad de clones el número de grupos de células tumorales baja de 12,3 a las 72 horas a 5,1 a las 96 horas. Esta disminución creemos que se debe a un proceso de fusión de clones. Más significativo aún es el dato que arroja este mismo

experimento realizado en fondo *dronc*⁻, en el cual las células *Igf*^{-/-} Ras^{V12} no pueden ser eliminadas. En esta situación pasamos de 9,6 grupos de células a las 72 horas AHS a 2,3 a las 96 horas AHS. En este caso la disminución en el número de clones no se puede atribuir a que estén desapareciendo por apoptosis, por lo que el hecho de que se están fusionando es más evidente. Se observa sin embargo un descenso en el número de grupos de células en comparación con un fondo silvestre. A las 72 horas AHS obtenemos 9,6 en fondo *dronc*⁻ en comparación con los 12,3 que observamos en fondo silvestre y a las 96 horas AHS obtenemos 2,3 en fondo *dronc*⁻ mientras que observamos 5,1 en fondo silvestre. Debido a que los clones tumorales no están siendo eliminados por competición celular el proceso de fusión de clones es más eficaz. Creemos que a este hecho se debe el descenso en el número de grupos de células observado.

En discos con alta densidad de clones es más fácil que varios clones estén cerca unos de los otros y se produzca una fusión entre ellos. Esta fusión forma grandes masas tumorales en las cuales, las células del centro del tumor no están en contacto con las células silvestres del exterior y por tanto están a salvo de ser detectadas como diferentes y eliminadas por competición celular. En el centro del tumor se ha formado por tanto un microambiente en el que no se produce competición celular. En estas grandes masas tumorales las células del borde del tumor siguen siendo eliminadas. Sin embargo si el tumor es suficientemente grande la alta proliferación del centro permite reemplazar estas células eliminadas y continuar creciendo. En este momento aparece gran cantidad de muerte en las células silvestres que rodean al clon. La eliminación de las células silvestres que rodean al clon hace que la competición celular a la que están sometidas las células *Igf*^{-/-} Ras^{V12} sea menor. Esto podría favorecer la progresión de los tumores puesto que disminuiría la presión que ejercen las células silvestres sobre las células tumorales del borde del clon.

El proceso de fusión de clones también se puede observar con choques térmicos de 7 minutos. En este caso el porcentaje de tumores que se forma es tan solo de un 8% pero es muy significativo que todos estos tumores formados con choques térmicos de 7 minutos estén producidos por fusiones de clones de origen anterior y posterior. Esto deja claro la importancia de crear un microambiente que proteja a los clones de la competición celular, facilitando así la formación de tumores. Sin embargo, al haber una menor concentración de clones, el proceso de fusión es más difícil. Quizás esta mayor dificultad para que dos o más clones se fusionen sea la causa de la baja proporción de tumores en discos con baja densidad de clones.

El hecho de que las células silvestres sean capaces de eliminar a células tumorales, incluso si estas proliferan más rápidamente juega un importante papel como supresor de tumores, como demuestra el que el porcentaje de tumores aumente significativamente en un fondo mutante para *dronc*⁻, de un 8% (cuando se produce la competición celular) a un 33% en fondo mutante para *dronc*. En este fondo mutante no se produce apoptosis, y por tanto las células tumorales no pue-

den ser eliminadas por competición celular. Consistente con la observación anterior, en discos con alta densidad de clones el porcentaje de tumores prácticamente no varía entre discos en fondo *dronc*⁺ y *dronc*⁻: en este caso, la eliminación de la apoptosis por competición celular a la que están sometidas las células *Igf*^{-/-} Ras^{V12} no tiene ningún efecto sobre el porcentaje de tumores puesto que la fusión de clones que se está dando tiene un papel protector sobre los clones tumorales equivalente al de la supresión de la competición celular o dicho de otro modo, la eliminación de la competición celular a la que están sometidos los clones tumorales es equivalente a la creación de un microambiente que protege de la muerte a los clones. Es importante resaltar que un proceso fundamental en la formación de un tumor es la evasión de la competición celular por parte de los tumores. En este caso concreto esto se produce mediante la creación de un microambiente que se forma gracias a la fusión de varios clones. Sin embargo, cabe tener en cuenta un escenario en el que la capacidad de proliferación del clon sea tan grande que por sí sólo sea capaz de crear ese microambiente y por tanto el proceso de fusión no sería necesario. El proceso de fusión de clones que se produce en nuestro caso es sólo una de las opciones que tienen las células tumorales de formar este microambiente necesario para evadir la competición celular.

D.- La competición celular como mecanismo supresor de tumores.

A la luz de los resultados surge la duda sobre cuál es el mecanismo que desencadena la competición celular. Clásicamente ha sido asociado con una diferencia en la tasa de proliferación (Morata y Ripoll, 1975; Simpson y Morata, 1981). Sin embargo, hay documentadas otras situaciones en las cuales una interacción a corta distancia entre dos tipos de células viables lleva a la eliminación de una de ellas sin que parezca existir una diferencia en la tasa de proliferación. Milán y cols. en el 2002 publicaron que las células que sobreexpresaban *spalt* (*sal*) eran perfectamente viables dentro del dominio *spalt*, sin embargo estas mismas células eran eliminadas fuera de ese dominio cuando están rodeadas por células que no expresan *sal*. Al parecer las células sobreexpresando *sal* fuera de su dominio eran reconocidas como diferentes y esto inducía la apoptosis. Adachi-Yamada y O'Connor (1999) hicieron observaciones similares con cambios de identidad entre proximal y distal. Estos resultados pueden reflejar la existencia de un mecanismo de "seguridad" encargado de eliminar células diferentes del tejido, células que no sean capaces de responder adecuadamente a los estímulos de su entorno. Proponemos un mecanismo similar en el caso de células mutantes para *Igf*. Estas células mutantes cuando se encuentran rodeadas de células silvestres son reconocidas como distintas. Se produce una interacción de corto alcance entre ellas, que lleva a la eliminación de las células *Igf*^{-/-} mediante la activación de JNK. En una publicación reciente se mostró la existencia de un mecanismo para eliminar células con mutaciones oncogénicas en el disco de ojo, en concreto células *scrib*^{-/-} en discos de ojo, basado en la activación endocítica de la ruta JNK (Igaki

y cols., 2009). En el caso de clones *lgl*^{-/-} en discos de ojo, la ruta endocítica no parece jugar un papel determinante a la hora de activarse la apoptosis en el disco de ala (Froldi y cols., 2010), por lo que el mecanismo exacto está por dilucidar. De confirmarse estos datos, significaría que el mecanismo para eliminar células tumorales en el disco de ala es diferente que en el disco de ojo, o bien que los mecanismos para eliminar células *lgl*^{-/-} y *scrib*^{-/-} son diferentes. En cualquiera de los dos casos esto pondría de relieve la importancia de este fenómeno ya que supondría la existencia de diversos sistemas para asegurar que este tipo de células sean eliminadas. Creemos que la competición celular es un mecanismo de supresión tumoral inherente al propio tejido. Esta “defensa” antitumoral sería una especie de sistema inmune encargado de eliminar células peligrosas, pero a diferencia de éste, no sería llevado a cabo por células especializadas sino por las mismas células que conforman el tejido. En esta línea de pensamiento se manifiesta también Igaki (2009) definiendo este “sistema inmune” como “intrinsic tumour suppression”.

Proponemos por tanto que hay dos premisas que se tienen que cumplir para la formación de tumores:

- 1.- la adquisición de características tumorales por parte de células normales.
- 2.- la capacidad de estas células tumorales de escapar a la competición celular destinada a eliminar células potencialmente peligrosas.

La primera característica se da cuando células normales adquieren mutaciones que afectan a la polaridad apico-basal (*lgl*, *scrib* y *dlg*) o mutaciones que afectan a la ruta endocítica (*avl*, *ept* o *vps25*). En el caso concreto de *lgl* creemos que su capacidad para formar tumores reside en el hecho de que no responda a las señales que se dan en el desarrollo para detener la proliferación. Aunque las células *lgl*^{-/-} proliferan a la misma velocidad que las células silvestres, continúan creciendo después de que el resto de tejidos hayan parado de crecer. Esta característica les permite formar tumores cuando una gran parte del tejido es mutante para *lgl*. Sin embargo, cuando se encuentran rodeadas de células silvestres, esta característica se demuestra insuficiente. De este hecho sacamos como conclusión que la competición celular puede tener no sólo la función de asegurar que el tejido esté formado por las células más fuertes, sino que también serviría para eliminar células diferentes o potencialmente peligrosas del tejido, independientemente de su tasa de división.

El segundo paso implicaría la adquisición de un mecanismo que dotara a las células de una protección frente a esta competición celular. Para ello es necesaria la creación de un microambiente en el cual el tamaño del clon llega a una masa crítica tal que las células del centro del tumor no están afectadas por competición celular y no son eliminadas. (Fig. 34).

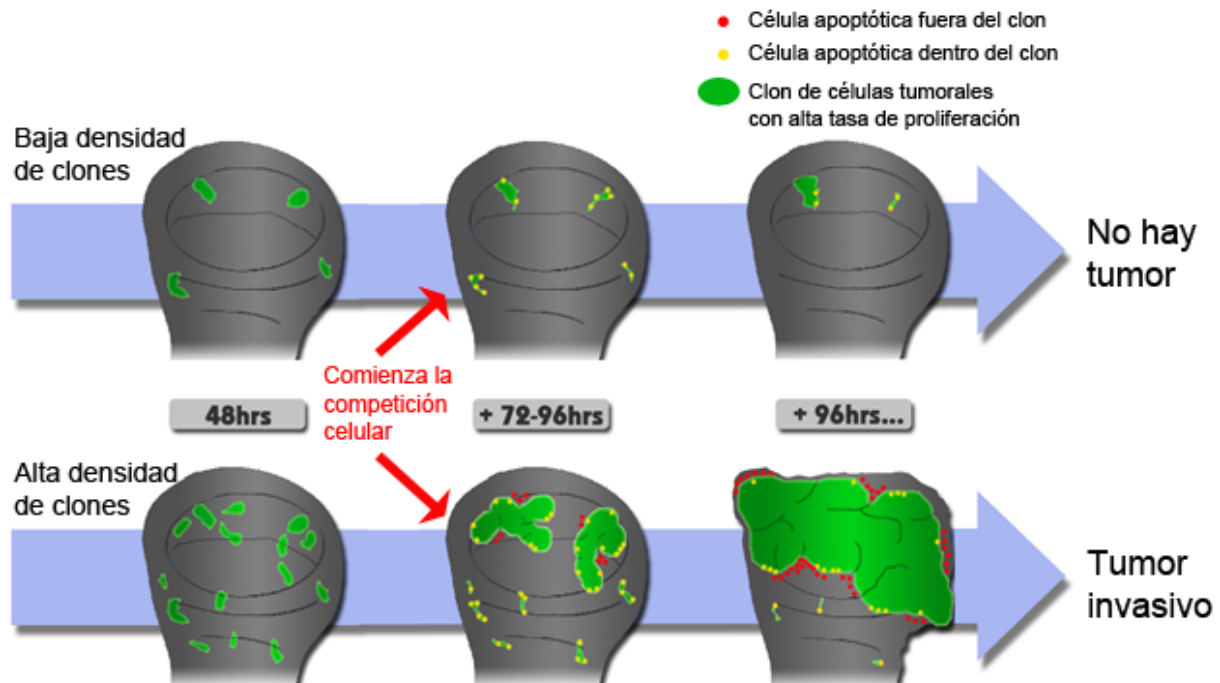


Figura 34. Modelo de formación y progresión de tumores *Igf^{-/-} UASRas^{V12}*.

En una situación en la que hay pocos clones por disco estos empiezan a ser eliminados por competición celular a partir de las 72 horas AHS, al final del desarrollo no se formarán tumores ya que la mayoría de las células potencialmente peligrosas son eliminadas del tejido. En una situación en la que se generan muchos clones tumorales los clones pequeños o aislados también desaparecen por competición celular. Sin embargo al haber tantos clones por disco, algunos de estos serán capaces de fusionarse y alcanzar una masa crítica en la cual las células del interior del clon están protegidas de la competición celular. Las células tumorales del borde del clon siguen siendo eliminadas pero si la masa que se produce de la fusión de estos clones es suficientemente grande la proliferación que se produce en el centro del clon es suficiente para reemplazar a estas células. En este momento las células tumorales empiezan a eliminar a las células silvestres que rodean al clon (puntos rojos) debido a la diferencia de proliferación. Al final del desarrollo en la mayoría de las ocasiones se producen tumores invasivos. Modificado de *Salvador Cenador*.

Esto se consigue primero adquiriendo una mayor tasa de proliferación celular mediante la inhibición de la ruta de Hippo. Este paso ayudaría a las células tumorales a sobreponerse a su eliminación por competición celular. En el caso de *Igf^{-/-} Ras^{V12}* haría falta también un proceso de fusión de un número suficiente de clones para crear esa masa crítica. Una vez alcanzada esta masa crítica las células de los bordes de los clones seguirían muriendo por competición celular, pero debido a la proliferación del centro del tumor, estas células de los bordes serían repuestas a mayor velocidad de la que son eliminadas. A partir de entonces el tumor empezaría a crecer hasta colonizar todo el tejido mostrando una alta tasa de proliferación celular. Esta mayor tasa de proliferación celular permitiría eliminar a

las células silvestres que rodean el clon, lo que podría facilitar la colonización del tejido por parte de las células tumorales.

Relevancia de los resultados obtenidos en mamíferos.

Los resultados obtenidos en esta tesis podrían aportar datos para el estudio de la formación de tumores en mamíferos y humanos. Un factor limitante para el estudio de tumores en humanos es la capacidad técnica que existe para detectar clínicamente tumores. La aparición de un tumor se da cuando una célula (Nowell, 1976) inmersa en el tejido adquiere características tumorales. Esta célula, ahora tumoral, se encontraría rodeada de células silvestres. Desde que aparece esta célula tumoral en el tejido hasta que es detectada puede pasar años dividiéndose sin que haya una manifestación fenotípica o que sea clínicamente detectable. Es en estos estadios primarios de la formación de un tumor donde el uso de *Drosophila* como organismo modelo puede ofrecer datos relevantes.

Competición celular como mecanismo supresor de tumores en mamíferos.

En el caso de humanos se ha determinado que aproximadamente un 1,6% de los genes que codifican para proteínas (unos 350 genes de 22000) (Stratton y cols., 2009), muestran mutaciones somáticas recurrentes que implicadas en el desarrollo de tumores. En ratones estos genes potencialmente tumorales se elevan hasta los 2000. A este dato de la cantidad de mutaciones que pueden generar tumores habría que sumar la tasa de mutación en las células ($\approx 3 \times 10^{-6}$), la cantidad de células de un individuo y los años de vida media de un ser humano. Teniendo en cuenta todos estos datos es obvio pensar que a lo largo de la vida de un ser humano la aparición espontánea de células tumorales es un fenómeno que ocurre con relativa frecuencia en todos los individuos. Dado que no toda la población desarrolla cáncer necesariamente ha de existir un mecanismo que detecte y elimine estas células potencialmente peligrosas. En esta tesis se ha demostrado que en *Drosophila*, algunas de estas mutaciones, de alguna manera son detectadas por las células silvestres que las rodean desencadenando el fenómeno de competición celular. Esto provoca que las células tumorales sean eliminadas por apoptosis, incluso si estos tumores tienen una alta capacidad proliferativa. Por lo tanto para progresar y llegar a invadir todo un tejido, las células tumorales necesitarían desarrollar mecanismos que les permitieran protegerse de esa competición celular a la que están sometidas.

Origen policlonal del cáncer

Los resultados de esta tesis sugieren que la fusión de varios clones puede ser uno de los mecanismos que protegen a las células tumorales de la competición celular. Para la fusión de clones se requeriría la presencia de varios clones de células con características tumorales en una misma zona, lo que apoya la línea de pensamiento que defiende un origen policlonal del cáncer. En el campo de la carcinogénesis existe la idea de que el origen de los tumores es monoclonal (Nowell, 1976), sin embargo algunos autores defienden el origen policlonal de los tumores (Heim y cols., 2001; Parsons, 2008). Un origen monoclonal de los tumores implica la aparición de una mutación en una célula. Esta célula mutante proliferaría, generando una población mutante con un mismo origen. En algunas de las células de este clon mutante se produciría una segunda mutación que sería la que finalmente lleve a la aparición del tumor metastásico. El origen policlonal de un tumor implica dos sucesos independientes de mutación en células relativamente cercanas que podrían interaccionar. En mamíferos se ha comprobado el origen policlonal de al menos 24 tipos distintos de cáncer (Parsons, 2008). En *Drosophila* también se ha comprobado que la interacción entre dos poblaciones distintas de células puede llevar a la formación de tumores neoplásico (Wu y cols., 2010). Los datos de fusión de clones obtenidos en esta tesis también apoyarían la idea de un origen policlonal en los tumores.

El estudio sobre el origen monoclonal o policlonal de los tumores es un tema de gran importancia a la hora de generar modelos más precisos del cáncer, lo que finalmente llevará a un mayor conocimiento de la enfermedad. *Drosophila* se demuestra como un modelo válido para seguir profundizando en este aspecto de la carcinogénesis.

VI. CONCLUSIONES



1.- Las células mutantes para *lgl* no tienen una menor tasa de proliferación que las células silvestres.

2.- Las células *lgl*^{-/-} son eliminadas del tejido por competición celular, no dependiendo ésta de la tasa de proliferación de las células *lgl*^{-/-}.

3.- Las células *lgl*^{-/-} no son capaces de formar tumores que colonicen el disco incluso cuando están protegidas de la apoptosis.

4.- Las células tumorales *lgl*^{-/-} UASRas^{V12} son eliminadas del tejido por competición celular a pesar de tener una mayor tasa de proliferación que las células silvestres que las rodean.

5.- La competición celular funciona como un mecanismo supresor de tumores por el cual el tejido elimina células potencialmente peligrosas.

6.- La inhibición de la vía de Hippo es suficiente para desencadenar el comportamiento tumoral en células *lgl*^{-/-}.

7.- La formación de un micro-ambiente de células *lgl*^{-/-} UASRas^{V12} protege a las células tumorales de la competición celular y aumenta su capacidad tumorigénica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y., y Matsumoto, K. (1999). Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* 400, 166-169.
- Adachi-Yamada, T., y O'Connor, M.B. (2002). Morphogenetic apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients. *Dev Biol* 251, 74-90.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Agrawal, N., Kango, M., Mishra, A., y Sinha, P. (1995). Neoplastic transformation and aberrant cell-cell interactions in genetic mosaics of lethal(2)giant larvae (*lgl*), a tumor suppressor gene of *Drosophila*. *Dev Biol* 172, 218-229.
- Alberts, B., Johnston, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walet, K. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. New York and London: Garland Science.
- Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827.

- Basler, K., and Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by *hedgehog* protein. *Nature* 368, 208-214.
- Bennett, F.C., and Harvey, K.F. (2006). Fat cadherin modulates organ size in *Drosophila* via the *Salvador/Warts/Hippo* signaling pathway. *Curr Biol* 16, 2101-2110.
- Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J.A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein *Lgl*. *Nature* 422, 326-330.
- Bilder, D. (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* 18, 1909-1925.
- Bilder, D., Li, M., and Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289, 113-116.
- Bissell, M.J., and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1, 46-54.
- Bosch, M., Serras, F., Martin-Blanco, E., and Baguna, J. (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* 280, 73-86.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brumby, A., Secombe, J., Horsfield, J., Coombe, M., Amin, N., Coates, D., Saint, R., and Richardson, H. (2004). A genetic screen for dominant modifiers of a cyclin E hypomorphic mutation identifies novel regulators of S-phase entry in *Drosophila*. *Genetics* 168, 227-251.
- Brumby, A.M., and Richardson, H.E. (2003). *scribble* mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J* 22, 5769-5779.

- Bryant, P.J. (1975). Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication. *J Exp Zool* 193, 49-77.
- Carroll, S.B., Grenier, J.K., Weatherbee, S.D. (2001) From DNA to diversity: Molecular genetics and the evolution of animal design. Blackwell Publishing Limited.
- Cavodeassi, F., Rodriguez, I., and Modolell, J. (2002). Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax. *Development* 129, 3815-3823.
- Cohen, B., McGuffin, M.E., Pfeifle, C., Segal, D., and Cohen, S.M. (1992). *apterous*, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev* 6, 715-729.
- Cohen, B., Simcox, A.A., and Cohen, S.M. (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* 117, 597-608.
- Chen, C.L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., and Halder, G. (2010) The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15810-15815.
- Cho, E., Feng, Y., Rauskolb, C., Maitra, S., Fehon, R., and Irvine, K.D. (2006). Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat Genet* 38, 1142-1150.
- de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., and Johnston, L.A. (2004). *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* 117, 107-116.
- Diaz-Benjumea, F.J., and Cohen, S.M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* 75, 741-752.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., and Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130, 1120-1133.

- Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.
- Frese, K.K., Latorre, I.J., Chung, S.H., Caruana, G., Bernstein, A., Jones, S.N., Donehower, L.A., Justice, M.J., Garner, C.C., and Javier, R.T. (2006). Oncogenic function for the *Dlg1* mammalian homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor. *EMBO J* 25, 1406-1417.
- Froldi, F., Ziosi, M., Garoia, F., Pession, A., Grzeschik, N.A., Bellosta, P., Strand, D., Richardson, H.E., and Grifoni, D. (2010) The *lethal giant larvae* tumour suppressor mutation requires dMyc oncoprotein to promote clonal malignancy. *BMC Biol* 8, 33.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P., and Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* 245, 251-253.
- Garcia-Bellido, A., and Santamaria, P. (1972). Developmental analysis of the wing disc in the mutant *Engrailed* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 72, 87-104.
- Gateff, E. (1978). Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* 200, 1448-1459.
- Gateff, E., and Schneiderman, H.A. (1969). Neoplasms in mutant and cultured wild-type tissues of *Drosophila*. *Natl Cancer Inst Monogr* 31, 365-397.
- Goulev, Y., Fauny, J.D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., and Zider, A. (2008). SCALLOPED interacts with *Yorkie*, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr Biol* 18, 435-441.
- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E., and Steller, H. (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila reaper*, *hid* and *grim* through inhibition of IAP function. *EMBO J* 19, 589-597.

- Greenspan, R.J. (1997) Fly Pushing. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Grusche, F.A., Degoutin, J.L., Richardson, H.E., and Harvey, K.F. (2011) The *Salvador/Warts/Hippo* pathway controls regenerative tissue growth in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 350, 255-266.
- Grzeschik, N.A., Parsons, L.M., Allott, M.L., Harvey, K.F., and Richardson, H.E. (2010) *Lgl*, aPKC, and Crumbs regulate the *Salvador/Warts/Hippo* pathway through two distinct mechanisms. *Curr Biol* 20, 573-581.
- Guillen, I., Mullor, J.L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G., and Guerrero, I. (1995). The function of *Engrailed* and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* 121, 3447-3456.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hariharan, I.K., and Bilder, D. (2006). Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 40, 335-361.
- Hay, B.A., and Guo, M. (2006). Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 623-650.
- Hay, B.A., Wassarman, D.A., and Rubin, G.M. (1995). *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 83, 1253-1262.
- Heim, S., Teixeira, M.A., and Pandis, N. (2001). Are some breast carcinomas polyclonal in origin? *J Pathol* 194, 395-397.
- Herz, H.M., Chen, Z., Scherr, H., Lackey, M., Bolduc, C., and Bergmann, A. (2006). *mps25* mosaics display non-autonomous cell survival and overgrowth, and autonomous apoptosis. *Development* 133, 1871-1880.

- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating *Yorkie*, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122, 421-434.
- Huh, J.R., Guo, M., and Hay, B.A. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase *Dronc* in a nonapoptotic role. *Curr Biol* 14, 1262-1266.
- Humbert, P.O., Grzeschik, N.A., Brumby, A.M., Galea, R., Elsum, I., and Richardson, H.E. (2008). Control of tumourigenesis by the *Scribble/Dlg/Lgl* polarity module. *Oncogene* 27, 6888-6907.
- Igaki, T., Pagliarini, R.A., and Xu, T. (2006). Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*. *Curr Biol* 16, 1139-1146.
- Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., and Bryant, P.J. (1995). The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev* 9, 534-546.
- Kanda, H., and Miura, M. (2004). Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J Biochem* 136, 1-6.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Klezovitch, O., Fernandez, T.E., Tapscott, S.J., and Vasioukhin, V. (2004). Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in *Lgl1* knockout mice. *Genes Dev* 18, 559-571.
- Kosaka, Y., Mimori, K., Tanaka, F., Inoue, H., Watanabe, M., and Mori, M. (2007). Clinical significance of the loss of MATS1 mRNA expression in colorectal cancer. *Int J Oncol* 31, 333-338.

- Kuphal, S., Wallner, S., Schimanski, C.C., Bataille, F., Hofer, P., Strand, S., Strand, D., and Bosserhoff, A.K. (2006). Expression of Hugl-1 is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene* 25, 103-110.
- Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H., and Miura, M. (2002). *Reaper*-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 4, 705-710.
- Lawrence, P. A. (1992) The making of a fly. Blackwell Scientific Publications.
- Lawrence, P.A., and Struhl, G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*? *Cell* 85, 951-961.
- Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22, 451-461.
- Li, W., and Baker, N.E. (2007). Engulfment is required for cell competition. *Cell* 129, 1215-1225.
- Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S., and Pan, D. (2010) The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10532-10537.
- Lu, H., and Bilder, D. (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 7, 1232-1239.
- Mann, R.S., and Morata, G. (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 243-271.
- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A.M., and Martinez-Arias, A. (1998). *Puckered* encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* 12, 557-570.

- Martin, F.A., Herrera, S.C., and Morata, G. (2009). Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 136, 3747-3756.
- Martin, F.A., and Morata, G. (2006). Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 133, 4421-4426.
- McEwen, D.G., and Peifer, M. (2005). *Puckered*, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. *Development* 132, 3935-3946.
- Mechler, B.M., McGinnis, W., and Gehring, W.J. (1985). Molecular cloning of lethal(2)giant larvae, a recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 4, 1551-1557.
- Milan, M., Perez, L., and Cohen, S.M. (2002). Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing. *Dev Cell* 2, 797-805.
- Moberg, K.H., Schelble, S., Burdick, S.K., and Hariharan, I.K. (2005). Mutations in *erupted*, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev Cell* 9, 699-710.
- Morata, G., and Lawrence, P.A. (1975). Control of compartment development by the *Engrailed* gene in *Drosophila*. *Nature* 255, 614-617.
- Morata, G., and Ripoll, P. (1975). *Minutes*: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol* 42, 211-221.
- Moreno, E., and Basler, K. (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* 117, 117-129.
- Moreno, E., Basler, K., and Morata, G. (2002). Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* 416, 755-759.

- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Oertel, M., Menthena, A., Dabeva, M.D., and Shafritz, D.A. (2006). Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 130, 507-520; quiz 590.
- Oliver, E.R., Saunders, T.L., Tarle, S.A., and Glaser, T. (2004). Ribosomal protein L24 defect in *belly spot and tail* (*Bst*), a mouse *Minute*. *Development* 131, 3907-3920.
- Ouyang, Z., Zhan, W., and Dan, L. (2010) *hScrib*, a human homolog of *Drosophila* neoplastic tumor suppressor, is involved in the progress of endometrial cancer. *Oncol Res* 18, 593-599.
- Pagliarini, R.A., and Xu, T. (2003). A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. *Science* 302, 1227-1231.
- Parsons, B.L. (2008). Many different tumor types have polyclonal tumor origin: evidence and implications. *Mutat Res* 659, 232-247.
- Perez-Garijo, A., Martin, F.A., and Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* 131, 5591-5598.
- Perez-Garijo, A., Shlevkov, E., and Morata, G. (2009). The role of Dpp and *Wg* in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development* 136, 1169-1177.
- Prober, D.A., and Edgar, B.A. (2000). Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. *Cell* 100, 435-446.
- Prober, D.A., and Edgar, B.A. (2002). Interactions between Ras1, dMyc, and dPI3K signaling in the developing *Drosophila* wing. *Genes Dev* 16, 2286-2299.

- Riesgo-Escovar, J.R., Jenni, M., Fritz, A., and Hafen, E. (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* 10, 2759-2768.
- Robinson, B.S., Huang, J., Hong, Y., and Moberg, K.H. (2010) Crumbs regulates *Salvador/Warts/Hippo* signaling in *Drosophila* via the FERM-domain protein Expanded. *Curr Biol* 20, 582-590.
- Ryoo, H.D., Gorenc, T., and Steller, H. (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the *Wingless* signaling pathways. *Dev Cell* 7, 491-501.
- Schimanski, C.C., Schmitz, G., Kashyap, A., Bosserhoff, A.K., Bataille, F., Schafer, S.C., Lehr, H.A., Berger, M.R., Galle, P.R., Strand, S. (2005). Reduced expression of Hugl-1, the human homologue of *Drosophila* tumour suppressor gene *lgf*, contributes to progression of colorectal cancer. *Oncogene* 24, 3100-3109.
- Silva, E., Tsatskis, Y., Gardano, L., Tapon, N., and McNeill, H. (2006). The tumor-suppressor gene fat controls tissue growth upstream of expanded in the hippo signaling pathway. *Curr Biol* 16, 2081-2089.
- Simpson, P., and Morata, G. (1981). Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing. *Dev Biol* 85, 299-308.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., and Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719-724.
- Sun, G., and Irvine, K.D. (2011) Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Dev Biol* 350, 139-151.
- Tabata, T. and Kornberg T.B. (1994) *Hedgehog* is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila*. *Cell* 76, 89-102.

- Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Schiripo, T.A., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2002). *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 110, 467-478.
- Thompson, B.J., Mathieu, J., Sung, H.H., Loeser, E., Rorth, P., and Cohen, S.M. (2005). Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component *Vps25* in *Drosophila*. *Dev Cell* 9, 711-720.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.
- Tsuruga T, Nakagawa S, Watanabe M, Takizawa S, Matsumoto Y, Nagasaka K, Sone K, Hiraie H, Miyamoto Y, Hiraie O, Minaguchi T, Oda K, Yasugi T, Yano T, Taketani Y. (2007). Loss of Hg1-1 expression associates with lymph node metastasis in endometrial cancer. *Oncol Res* 16, 431-435.
- Tyler, D.M., Li, W., Zhuo, N., Pellock, B., and Baker, N.E. (2007). Genes affecting cell competition in *Drosophila*. *Genetics* 175, 643-657.
- Vaccari, T., and Bilder, D. (2005). The *Drosophila* tumor suppressor *vps25* prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev Cell* 9, 687-698.
- Vaccari, T., and Bilder, D. (2009). At the crossroads of polarity, proliferation and apoptosis: the use of *Drosophila* to unravel the multifaceted role of endocytosis in tumor suppression. *Mol Oncol* 3, 354-365.
- Weston, C.R., and Davis, R.J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 12, 14-21.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264, 677-683.

- Wodarz, A., and Nathke, I. (2007). Cell polarity in development and cancer. *Nat Cell Biol* 9, 1016-1024.
- Woodhouse, E., Hersperger, E., and Shearn, A. (1998). Growth, metastasis, and invasiveness of *Drosophila* tumors caused by mutations in specific tumor suppressor genes. *Dev Genes Evol* 207, 542-550.
- Wu, M., Pastor-Pareja, J.C., and Xu, T. (2010) Interaction between Ras^(V12) and *scribbled* clones induces tumour growth and invasion. *Nature* 463, 545-548.
- Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., and Pan, D. (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell* 14, 388-398.
- Xu, D., Li, Y., Arcaro, M., Lackey, M., and Bergmann, A. (2005). The CARD-carrying caspase *Dronc* is essential for most, but not all, developmental cell death in *Drosophila*. *Development* 132, 2125-2134.
- Xu, T., and Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223-1237.
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., and Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* 121, 1053-1063.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian *Lgl* forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol* 13, 734-743.
- Zecca, M., Basler, K., and Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of *Engrailed*, *hedgehog* and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* 121, 2265-2278.

- Zecca, M., Basler, K., and Struhl, G. (1996). Direct and long-range action of a *wingless* morphogen gradient. *Cell* 87, 833-844.
- Zecca, M., and Struhl, G. (2002a). Control of growth and patterning of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* 129, 1369-1376.
- Zecca, M., and Struhl, G. (2002b). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* 129, 1357-1368.
- Zeitlinger, J., Kockel, L., Peverali, F.A., Jackson, D.B., Mlodzik, M., and Bohmann, D. (1997). Defective dorsal closure and loss of epidermal decapentaplegic expression in *Drosophila* *fos* mutants. *EMBO J* 16, 7393-7401.
- Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B., and Jiang, J. (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell* 14, 377-387.
- Zhou, D., Conrad, C., Xia, F., Park, J.S., Payer, B., Yin, Y., Lauwers, G.Y., Thasler, W., Lee, J.T., Avruch, J. and Bardeesy, N. (2009). Mst1 and Mst2 maintain *hepatocyte* quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell* 16, 425-438.

VIII. ANEXO

A tumor-suppressing mechanism in *Drosophila* involving cell competition and the Hippo pathway

Javier Menéndez¹, Ainhua Pérez-Garijo^{1,2}, Manuel Calleja, and Ginés Morata³

Centro de Biología Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28049, Spain

Communicated by A. García-Bellido, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, June 29, 2010 (received for review June 9, 2010)

Mutant larvae for the *Drosophila* gene *lethal giant larva* (*lgl*) develop neoplastic tumors in imaginal discs. However, *lgl* mutant clones do not form tumors when surrounded by wild-type tissue, suggesting the existence of a tumor-suppressing mechanism. We have investigated the tumorigenic potential of *lgl* mutant cells by generating wing compartments that are entirely mutant for *lgl* and also inducing clones of various genetic combinations of *lgl* cells. We find that *lgl*[−] compartments can grow indefinitely but *lgl*[−] clones are eliminated by cell competition. *lgl* mutant cells may form tumors if they acquire constitutive activity of the Ras pathway (*lgl*[−] *UAS-ras*^{V12}), which confers proliferation advantage through inhibition of the Hippo pathway. Yet, the majority of *lgl*[−] *UAS-ras*^{V12} clones are eliminated in spite of their high proliferation rate. The formation of a tumor requires in addition the formation of a microenvironment that allows mutant cells to evade cell competition.

Drosophila imaginal discs | Hippo pathway | *lgl*

The formation of tumors normally occurs after a transformation of groups of cells that acquire a set of properties allowing them to proliferate in excess and to colonize normal tissues, superseding nontumor cells. In *Drosophila* there are a number of mutations known to cause excessive growth leading to the production of tumors. Among these mutations, there is the group of tumor suppressor genes *scribble* (*scrib*), *disc large* (*dlg*), and *lethal giant larvae* gene (*lgl*), whose function is necessary for normal cell polarity and asymmetric cell divisions (reviews in refs. 1–3). In mutant larvae for *scrib* and *lgl* the neuroblasts and imaginal cells develop massive neoplastic tumors that eventually kill the larvae. These tumors exhibit many of the properties of human tumors, including loss of tissue architecture and alterations of cell shape. Moreover, the human homologs of these genes are also associated with the formation of diverse types of cancers (4, 5).

These studies have identified genetic defects that may lead to tumor formation but are not informative about how tumors appear and progress within normal tissue. From this perspective, it is of interest to consider the behavior of cells mutant for *scrib* or *lgl*. Although mutant homozygous larvae for these genes develop extensive tumors in imaginal discs, clones of mutant cells surrounded by wild-type tissue do not produce tumors (6–9). Furthermore, Brumby and Richardson (6) and Igaki et al. (8) have shown that *scrib* tumorous cells are eliminated by JNK-dependent apoptosis. It appears that the potential of *scrib* and *lgl* mutant cells to form tumors depends on the cellular context: if they are surrounded by “like” cells they develop tumors, but if surrounded by normal cells they do not. This suggests the existence of a tissue-specific mechanism that recognizes individual features of cells and proceeds to the elimination of undesirable cells. This behavior resembles the phenomenon of cell competition (10–12); a compartment-specific short-range interaction between cells with different division rates that leads to JNK-mediated apoptosis of the slower dividing cells. A similar kind of interaction may also function to eliminate abnormal or malignant cells that may arise in development.

The observations that constitutive expression of the Ras pathway (6, 9) rescues the lethality of *lgl* or *scrib* clones and causes tumorous growth indicate that under certain conditions the tumor-suppressing mechanism can be evaded.

To address this issue we have analyzed the growth of discs and compartments mutant for *lgl* and also the behavior of clones of *lgl* mutant cells of various genetic combinations developing in normal (*lgl*/+) background. We find that *lgl* mutant clones are normally eliminated by a process akin to cell competition, but constitutive Ras activity (*lgl*[−] *ras*^{V12}) confers on the clones the potential to survive and generate tumors. *lgl*[−] *ras*^{V12} clones acquire high growth rate through down-regulation of the Hippo (Hpo) pathway, but in spite of their growth advantage many of these clones are also eliminated. Our results indicate that clones of *lgl* mutant cells developing in normal tissue can form a tumor when (i) the Hpo pathway is inhibited or down-regulated, which confers *lgl*[−] cells a high proliferation rate, and (ii) the groups of fast proliferating cells are able to merge together to generate a microenvironment that allows the group to overcome cell competition and to continue growing.

Results and Discussion

Entire *lgl*[−] Discs or Compartments Can Grow Indefinitely, but Isolated *lgl*[−] Cells Are Eliminated by JNK-Mediated Apoptosis. As reported long ago (13), *lgl* mutant larvae are unable to pupate and remain a long time in the culture medium to finally die as gigantic larvae when they are 12–13 d old. The CNS and the imaginal discs develop into extensive tumors that reach very large size (14), (Fig. S1C). We have studied the growth dynamics of the discs of mutant larvae (see Fig. S1 legend for details) and found that they grow actively as long as the larva is alive. Thus a principal feature of *lgl* mutant discs is that, unlike the wild type, they continue growing past the normal body and tissue size. We have reached a similar conclusion after studying the growth of posterior compartments that are entirely mutant for *lgl*. In larvae of genotype *lgl*[−] *FRT40A/M(2)24F FRT40A; UAS-Flp hh-Gal4* (see *Materials and Methods*) most or all of the posterior (P) compartment becomes homozygous for *lgl*, whereas the anterior (A) compartment remain *lgl*⁺ and serves as control. We find that whereas the control *lgl*⁺ anterior compartment stops growth once it has reached final size, the *lgl*[−] compartment continues growing and reaches a large size (Fig. S1D–F). This can be shown by the comparison of the P/A size ratios in larvae of different ages. The posterior *lgl*[−] compartment is initially somewhat smaller than a wild type, the P/A size ratio is 0.43 ($n = 18$) in 144-h larvae, whereas the normal value is 0.65 (15). However, by 168 h, the P/A ratio is 0.84 ($n = 15$) and in 216-h larvae, it is 1.25 ($n = 10$). These observations indicate that *lgl* mutant cells proliferate indefinitely, as they do not respond to the general mechanism that arrests growth when the final stereotyped size of compartments (15) has

Author contributions: J.M., A.P.-G., and G.M. designed research; J.M., A.P.-G., and M.C. performed research; J.M., A.P.-G., M.C., and G.M. analyzed data; and G.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

¹J.M. and A.P.-G. contributed equally to this work.

²Present address: The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10065.

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: gmorata@cbm.uam.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1009376107/-DCSupplemental.